



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Caracterização química e identidade genética de *Dalbergia ecastaphyllum* para produção de extratos padronizados

LUCYANA SANTOS DE MENDONÇA MELO

São Cristóvão (SE)
2016



Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Caracterização química e identidade genética de *Dalbergia ecastaphyllum* para produção de extratos padronizados

LUCYANA SANTOS DE MENDONÇA MELO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Renorbio da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Edilson Divino de Araújo

São Cristóvão (SE)
2016

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE

M528c Melo, Lucyana Santos de Mendonça
Caracterização química e identidade genética de *Dalbergia ecastaphyllum* para produção de extratos padronizados / Lucyana Santos de Mendonça Melo ; orientador Edilson Divino de Araújo. – São Cristóvão, 2016.
111 f. : il.

Tese (doutorado em Biotecnologia) – Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Universidade Federal de Sergipe, 2016.

1. Biotecnologia. 2. *Dalbergia ecastaphyllum*. 3. Marcadores biológicos. 4. Compostos biotivos. I. Araújo, Edilson Divino de, orient. II. Título.

CDU 606:582.736.3

LUCYANA SANTOS DE MENDONÇA MELO

Caracterização química e identidade genética de *Dalbergia ecastaphyllum* para produção de extratos padronizados

APROVADA EM: ____/____/____

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Renorbio da Universidade Federal de Sergipe e aprovada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Edilson Divino de Araújo (Orientador)
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Carlos Alfredo Lopes de Carvalho
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Prof. Dr. Daniel Pereira da Silva
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Marcus Vinícius Aragão Batista
Universidade Federal de Sergipe

Profa. Dra. Silmara de Moraes Pantaleão
Universidade Federal de Sergipe

São Cristóvão (SE)
2016

AGRADECIMENTOS

Ao **Senhor meu Deus** que esteve sempre ao meu lado durante esta caminhada. Das muitas vezes em que o caminho tornou-se tortuoso e pensei em desistir, Ele fortaleceu a minha fé e foi comigo, transformando meu sonho em realidade. Esse título é para honra e glória do Senhor Jesus.

A meus pais, **Hélio Mendonça e Telma Cruz**, e minhas irmãs, **Raissa e Camila**, pelo incentivo e apoio ao longo desta etapa, pelos conselhos, atenção, paciência, amor, carinho e principalmente por acreditarem em meu potencial. Amo muito vocês!

A meu amado esposo, **Rodrigo Melo**, que esteve sempre ao meu lado, me incentivando e me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amor, paciência, compreensão, apoio, e alegria, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho. Te Amo!

Ao meu orientador **Prof. Dr. Edilson Divino** por seu apoio, carinho, confiança, sincera amizade e por todos os ensinamentos transmitidos. A você minha gratidão e admiração pela pessoa maravilhosa que é. Deus o abençoe sempre!

Ao Prof. Dr. **Marcus Batista** pela disponibilidade que sempre revelou para comigo, por sua colaboração na realização desta pesquisa sempre proporcionando discussões e sugestões pertinentes que serviram para crescimento, aprendizado e incentivo.

A Profa. Dra. **Lisiane Freitas** pela colaboração, apoio, disponibilidade de seu laboratório e pelos conhecimentos transmitidos nas análises cromatográficas.

Aos professores, Dr. **Daniel Pereira** e Dra. **Silmara Pantaleão**, por aceitarem participar da minha banca de qualificação. Sou muito grata por toda contribuição e sugestões apresentadas para o aperfeiçoamento deste trabalho.

A Profa. Dra. **Juliana Cordeiro** pelo carinho, atenção e disponibilidade, mesmo quando não tinha tempo. Repito meus agradecimentos da dissertação: “Pra mim você é um exemplo de pessoa e profissional a ser seguido”. Te admiro muito!

A querida Dra. **Sona Jain** em reconhecimento pelas valiosas sugestões oferecidas ao longo deste doutorado, fundamentais para realização deste trabalho e principalmente pela amizade e carinho.

Aos meus colegas do Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia, **Everton, Genilda e Rosane** meu muito obrigada. A amizade, companheirismo e ajuda de vocês foram fatores muito importantes na realização desta Tese.

Ao Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes da UFS em especial à **Juciara, Roberta, Édica, Nilmara, Priscila e Fabrício**. Obrigada pelo auxílio na realização das análises cromatográficas.

A Profa. Dra. **Alexandra Sawaya** da UNICAMP e sua aluna de doutorado Msc. **Begoña López** pela colaboração na execução das análises de fingerprint e UHPLC. Obrigada pela parceria.

À **Capes** pela concessão da bolsa de demanda social.

A **todos os familiares e amigos** que não foram citados, mas que torcem por mim e estão felizes por mais uma conquista. O meu muito obrigada!

E por fim, muito obrigada a todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Irmãos, quanto a mim, não julgo havê-lo alcançado; mas uma coisa faço; esquecendo-me das coisas que para trás ficam e avançando para as que diante de mim estão, prossigo para o alvo.”

(Filipenses 3:13-14)

RESUMO

A *Dalbergia ecastaphyllum* foi determinada como a origem botânica da própolis vermelha brasileira através de estudos químicos e moleculares. Este fato elevou a quantidade de pesquisa com essa espécie vegetal. O Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI concedeu a Denominação de Origem a Própolis vermelha e Extrato de própolis vermelha de Alagoas cuja composição apresenta, entre outros compostos químicos, os marcadores formononetina e daidzeína. Entretanto, vários estudos têm identificado estes marcadores em amostras de *D. ecastaphyllum* e própolis vermelha de Sergipe. O objetivo deste trabalho foi definir a impressão digital de *D. ecastaphyllum* da região do baixo São Francisco por meio de marcadores químicos e moleculares, além de avaliar a atividade biológica para possibilitar o desenvolvimento de extratos padronizados com teores conhecidos de princípios ativos. Os perfis cromatográficos das plantas e da própolis vermelha apresentaram similaridade. Os resultados do HPLC demonstraram que as diferentes partes da planta possuem perfis químicos semelhantes. O composto ácido gálico foi identificado em todas as partes da planta, porém apenas na entrecasca foi encontrado os marcadores químicos formononetina e a biochanina A. O fingerprint ESI(-)-MS e as análises realizadas por UHPLC-MS foram mais precisas, pois os compostos formononetina, biochanina A e daidzeína foram identificados em todas as amostras. Os resultados do sequenciamento para a avaliação da identidade genética das populações de *Dalbergia* demonstraram que estas são muito homogêneas, possuindo exatamente o mesmo haplótipo para a região analisada. Todos os extratos foram capazes de inibir o desenvolvimento das cepas clínicas *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os compostos ácido gálico e formononetina foram identificados, quantificados e utilizados como parâmetro para padronização do extrato de *Dalbergia*. Os resultados deste estudo demonstram que nem todos os compostos presentes nos extratos possuem atividade frente aos microrganismos utilizados e que provavelmente a ação combinada entre eles diminui a potência biológica do composto ácido gálico. Para se obter atividade antimicrobiana efetiva nestas amostras pode-se padronizar o extrato com a quantidade mínima de 1% de ácido gálico e 4% de formononetina. De acordo com os resultados a *D. ecastaphyllum* do baixo São Francisco têm as mesmas características genéticas e perfis químicos similares apresentando inclusive os marcadores químicos considerados para a própolis vermelha alagoana. Faz-se necessário a realização de mais estudos comparativos entre as própolis da região nordeste visando à possibilidade da denominação de origem geográfica ser estendida para outros estados. Infere-se que, em relação aos marcadores químicos, qualquer parte da planta pode ser utilizada. Entretanto, sugerimos o uso da entrecasca como parte preferencial da planta para a produção de extratos em função da maior concentração de compostos encontrada. Embora os estudos de correlação indiquem que os compostos analisados têm atividade antimicrobiana, será necessário avaliar a atividade destes compostos isolados para confirmar esta hipótese. A similaridade genética das plantas e a presença de diversos marcadores químicos, bem como a facilidade de propagação dessa planta em sistema de cultivo possibilitam a exploração de um novo caminho de obtenção de compostos bioativos de forma direta a partir de extratos da entrecasca de *D. ecastaphyllum*.

Palavras-chave: marcador, composto biativo, denominação de origem, ácido gálico.

ABSTRACT

The *Dalbergia ecastaphyllum* was determined as a botanical origin of Brazilian red propolis by chemical and molecular studies. This fact raised the amount of research on this plant species. The National Institute of Industrial Property granted the designation of origin red propolis and Alagoas propolis extract whose composition has, among other chemical compounds, formononetin and daidzeína markers. However, several studies have identified the chemical markers of this product in samples of *D. ecastaphyllum* and propolis of Sergipe. The objective of this work was to define the fingerprint *D. ecastaphyllum* of low São Francisco by chemical and molecular markers, in addition to evaluating the biological activity to enable the development of standardized extracts with known concentrations of active ingredients. The chromatographic profiles of plants and propolis showed similarity. The HPLC results showed that the different parts of the plant have similar chemical profiles. The compound gallic acid were identified in all plant parts, but only on the bark been found formononetin and biochanin A chemical markers. The fingerprint ESI(-)-MS and analyzes by UHPLC-MS were more accurate, because the compounds formononetin, biochanin A and daidzein were identified in all samples. The results of the sequencing for evaluation of the genetic identity of populations of *Dalbergia* demonstrated that they are highly homogeneous, having exactly the same haplotype for the analyzed region. All extracts were able to inhibit the development of clinical strains of *S. aureus* and *P. aeruginosa*. The compounds gallic acid and formononetin were identified, quantified and used as parameters for standardization of *Dalbergia* extract. The results of this study demonstrate that not all compounds present in the extracts possess activity against the microorganisms used and probably the combined action between them decreases the biological potency of gallic acid compound. To achieve effective antimicrobial activity in these samples can standardize the extract with a minimum amount of 1% gallic acid and 4% formononetin. According to the results *D. ecastaphyllum* low San Francisco have the same genetic characteristics and chemical profiles including presenting the chemical markers considered for Alagoas propolis. It is necessary to conduct more comparative studies between propolis the northeastern region to the possibility of geographical designation of origin be extended to other states. It is inferred that, compared to chemical markers, any part of the plant can be used. However, we suggest the use of bast as the preferred part of the plant for the production of extracts due to the higher concentration of compounds found. While correlation studies indicate that the compounds analyzed have antimicrobial activity, you need to evaluate the activity of these compounds isolated to confirm this hypothesis. The genetic similarity of plants and the presence of several chemical markers, as well as ease of propagation of this plant in cultivation system enables the operation of a new way of obtaining bioactive compounds directly from the inner bark of *D. ecastaphyllum* extracts.

Keywords: marker, biativo compound, designation of origin, gallic acid.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

| | |
|--|----|
| Figura 1: Espécime de <i>D. ecastaphyllum</i> coletada na região do baixo São Francisco. | 20 |
|--|----|

Capítulo II

| | |
|--|----|
| Figura 1: Potencial de distribuição de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> e detalhes da região de amostragem. Na legenda, a cor vermelha refere-se a região com maior incidência de <i>D. ecastaphyllum</i> no Brasil e a cor azul refere-se a regiões com menor probabilidade de ocorrência (LIMA, 2014). | 54 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 2: Perfil RP-HPLC. A: Comparação entre amostras de <i>D. ecastaphyllum</i> ; B: Comparação entre <i>D. ecastaphyllum</i> e própolis vermelha de Sergipe. | 56 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 3: Impressão digital ESI(-)-MS de <i>D. ecastaphyllum</i> e própolis vermelha de Sergipe | 57 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 4: UHPLC-MS chromatogramas dos íons m/z 267 – formononetina (A-D), m/z 283 - biochanina A (E-H), m/z 255 – pinocembrina (I-K) e m/z 253 – daidzeina (L-N) em <i>D. ecastaphyllum</i> e em própolis vermelha de Sergipe. | 58 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 5: UHPLC-ESI(-). MS/MS de formononetina (A), biochanina A (B), daidzeina (C) and pinocembrina (D) em <i>D. ecastaphyllum</i> de Sergipe. | 59 |
|---|----|

Capítulo III

| | |
|---|----|
| Figura 1: Sobreposição dos cromatogramas de HPLC das diferentes partes da planta. | 69 |
|---|----|

| | |
|---|----|
| Figura 2: Impressão digital de diferentes partes de <i>D. ecastaphyllum</i> . | 70 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 3: Avaliação da composição das partes de <i>D. ecastaphyllum</i> por UHPLC-MS | 70 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Figura 4: Análises ESI(-)-MS/MS. Íon m/z 267 (Formononetina) encontrado em todas as amostras analisadas. | 71 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 5: Análise ESI(-)-MS/MS mostrando o íon m/z 283 (Biochanina A) em todas as amostras de <i>D. ecastaphyllum</i> . | 71 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figura 6: Análise ESI(-)-MS/MS mostrando o íon m/z 253 de Daidzeina. | 71 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Figura 7: Análise ESI(-)-MS/MS mostrando o íon m/z 255 de Pinocembrina. | 72 |
|---|----|

Capítulo IV

| | |
|--|----|
| Figura 1: Sobreposição dos cromatogramas das amostras de <i>D. ecastaphyllum</i> | 83 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

Capítulo I

Tabela 1. Constituintes e atividades biológicas de algumas espécies do gênero *Dalbergia* relatados na literatura. 17

Tabela 2. Compostos descritos presentes na *D. ecastaphyllum* e na própolis vermelha brasileira até o ano de 2015. 23

Tabela 3. Compostos descritos na própolis vermelha de várias localidades que não foram encontrados em *D. ecastaphyllum* até o ano de 2015. 24

Capítulo II

Tabela 1: Resultados do Blast de *D. ecastaphyllum*. Apenas os melhores blast hits são reportados. 60

Tabela 2: As estimativas de divergência evolutiva sobre pares de sequência entre os grupos. 60

Capítulo III

Tabela 1: Quantificação dos compostos encontrados nas partes da planta *D. ecastaphyllum* por RP-HPLC. 70

Capítulo IV

Tabela 1: Teores de Fenóis totais e Flavonoides e atividade antioxidante dos extratos 82

Tabela 2: Quantificação dos compostos encontrados nos extratos *D. ecastaphyllum* por HPLC 83

Tabela 3: Teores dos compostos majoritários encontrados em todas as amostras 84

Tabela 4: Concentração dos padrões comerciais utilizada nas análises antimicrobiana 85

Tabela 5: Atividade antimicrobiana dos extratos de *D. ecastaphyllum* e das diferentes concentrações dos compostos químicos identificados nas amostras 85

SUMÁRIO

| | |
|---|------------|
| INTRODUÇÃO | 12 |
| CAPITULO I - REVISÃO DA LITERATURA | 14 |
| 1. Produtos Naturais | 14 |
| 2. Considerações sobre a família Fabaceae | 15 |
| 3. O gênero <i>Dalbergia</i> | 16 |
| 4. <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> | 19 |
| 5. <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> e a Própolis vermelha brasileira | 21 |
| 6. Identidade genética | 25 |
| 7. Marcadores químicos | 27 |
| 8. Métodos cromatográficos para determinação de compostos bioativos | 29 |
| 9. Atividades biológicas | 32 |
| 10. Padronização de extratos vegetais | 35 |
| 11. Referências | 37 |
| CAPITULO II - Similaridade química e genética entre <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> e própolis vermelha do Nordeste do Brasil. | 51 |
| CAPITULO III - Perfil fitoquímico e impressão digital de <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> do Nordeste do Brasil. | 65 |
| CAPITULO IV - Caracterização química e atividade biológica da <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> para produção de extratos padronizados. | 77 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 90 |
| APÊNDICE A | 92 |
| APÊNDICE B | 99 |
| ANEXO A | 110 |
| ANEXO B | 111 |

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais têm sido uma fonte valiosa de moléculas com propriedades biológicas e representam uma importante alternativa para identificação de novos compostos bioativos utilizados pela indústria farmacêutica (ATANASOV et al., 2015).

Dentre à enorme diversidade de produtos naturais existentes está a própolis, produto produzido por abelhas a partir de substâncias vegetais. Esta é comercializada pela indústria farmacêutica como uma alternativa terapêutica. Por ser uma fonte de compostos bioativos e possuir características físico-químicas e biológicas diferenciais, a variedade vermelha tem sido bastante estudada (MENDONÇA et al., 2015a). Para avaliar a origem botânica correta do produto apícola e a partir disto, produzir extratos padronizados, deve-se realizar a quantificação dos princípios ativos e a detecção do marcador químico.

A composição da própolis é um reflexo da flora utilizada pelas abelhas. Estudos demonstraram que a origem botânica da própolis vermelha é a espécie *Dalbergia ecastaphyllum* (DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008; JAIN et al., 2014). Porém o número de pesquisas a respeito desta planta do ponto de vista químico e farmacológico é ínfimo. Isto tem despertado interesse, pois a extração dos marcadores químicos da própolis vermelha para a produção de extratos poderia ser realizada diretamente da espécie vegetal em alternativa ao produto apícola. Para isso, se faz necessário a realização de estudos que identifiquem em qual parte da planta é obtido maior quantidade de compostos bioativos, se diferentes populações da mesma espécie produzem os mesmos compostos e principalmente, se possuem atividades biológicas.

Estas análises são indispensáveis para garantir a eficácia, segurança e reprodutibilidade da atividade farmacológica do extrato vegetal tornando possível a produção e comercialização deste produto. De acordo com Rasheed et al. (2012) para obter uma padronização de extratos é necessário que os princípios ativos presentes na origem botânica estejam contidos no produto final, assegurando a quantidade e potência dos compostos na preparação e, com isso, possibilitando a obtenção de lotes reprodutíveis gerando um produto de alta qualidade com diferencial no mercado.

Desta forma, o presente trabalho teve por objetivo definir a impressão digital de *D. ecastaphyllum* da região do baixo São Francisco através de marcadores químicos e moleculares, além de avaliar a atividade biológica para possibilitar o desenvolvimento de extratos padronizados com teores conhecidos de princípios ativos. Este trabalho foi dividido em capítulos, onde no primeiro capítulo foi realizada uma revisão de literatura sobre os temas

estudados. O segundo capítulo intitulado por “Chemical and genetic similarity between *Dalbergia ecastaphyllum* and red propolis from the Northeastern Brazil.”, teve como objetivo comparar a identidade genética e química entre as populações de *D. ecastaphyllum* da região do Baixo São Francisco provenientes da margem Norte do rio São Francisco (estado de Alagoas) e da margem Sul do rio (estado de Sergipe). O terceiro capítulo intitulado “Phytochemical profile and fingerprinting from distinct anatomical parts of *Dalbergia ecastaphyllum* using different chromatographic techniques” teve por objetivo utilizar diferentes técnicas cromatográficas para identificar em qual das diferentes partes da planta (entrecasca, caule e folha) de *D. ecastaphyllum* os marcadores químicos são encontrados. O quarto e último capítulo intitulado “Caracterização química e atividade biológica de *Dalbergia ecastaphyllum* para produção de extratos padronizados” teve por objetivo produzir extratos de *D. ecastaphyllum* do nordeste brasileiro, padronizá-lo em compostos fenólicos, e realizar avaliação da atividade antimicrobiana.

REVISÃO DA LITERATURA

1. Produtos Naturais

Os produtos naturais têm sido essenciais para a descoberta e desenvolvimento de fármacos. Dentre eles, as plantas desempenham papel fundamental como fonte de princípios ativos para os medicamentos terapêuticos (XAVIER et al., 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), nos países desenvolvidos, 25% dos medicamentos são derivados de plantas, assim como cerca de 80% dos países em desenvolvimento dependem dos medicamentos tradicionais onde, 85% destes são produzidos a partir de extratos vegetais (SENTHILKUMAR et al., 2013; XAVIER et al., 2015). Estes produtos apresentam pequenas moléculas conhecidas como metabólitos secundários que não estão envolvidas nos processos vitais das células e tem como principal função aumentar a probabilidade de sobrevivência de um ser vivo por repelir ou atrair outros organismos (GURNANI et al., 2014).

Segundo Klein et al. (2009), desde 1886 são descritos em inventários a abundância das plantas brasileiras produtoras de frutos alimentares, resinas, óleos, gomas, aromas, e, principalmente, o potencial medicinal. Produtos naturais agem como moléculas de ligação para a síntese de vários medicamentos potentes devido a diversidade estrutural incomparável, a dimensão relativamente pequena de muitos deles e suas propriedades farmacológicas, isto é, a capacidade de ser absorvido e metabolizado (STICHER, 2008). Devido à variedade da flora brasileira, os estudos com as plantas empregadas popularmente tem propiciado a busca de novos compostos bioativos (COUTINHO et al., 2009).

Até o século XVIII, os componentes ativos da maioria dos medicamentos à base de plantas eram desconhecidos. Com o avanço das pesquisas em técnicas de separação, isolamento e caracterização tornou-se possível isolar, identificar e até quantificar os compostos bioativos dos produtos naturais (STICHER, 2008).

Considerando que uma espécie vegetal pode conter muitos compostos, o processo de separação e isolamento pode ser longo e tedioso e está associado a resultados imprevisíveis, porém com os avanços técnicos, é possível rastrear e avaliar as atividades farmacológicas dos constituintes presentes em recursos naturais de forma eficiente (GURNANI et al., 2014). Devido a isso, o isolamento de produtos naturais geralmente combina várias técnicas de separação, as quais dependem da solubilidade, volatilidade e estabilidade dos compostos a serem separados (STICHER, 2008).

Das espécies vegetais que eram tradicionalmente utilizadas em etnomedicina ou etnobotânica derivaram um significativo número de medicamentos. Entretanto, outros foram descobertos inicialmente através de um rastreio aleatório de extratos de plantas, determinando a sua atividade biológica *in vitro* ou *in vivo* (KRAUSE & TOBIN, 2013). Gurnani et al. (2014) afirmaram que os compostos bioativos derivados de espécies vegetais tem uma longa história de uso clínico por apresentar melhor aceitação por parte da população.

Pelo menos 25% de todos os medicamentos modernos são derivados diretamente ou indiretamente de plantas medicinais, principalmente por meio da aplicação de tecnologias modernas ao conhecimento tradicional (MARTINS, 2013). Entretanto, segundo a OMS, essa porcentagem pode ser maior que 60% quando se trata de certas classes de produtos farmacêuticos, como medicamentos antitumorais e antimicrobianos (WHO, 2011).

De acordo com o relatório da BCC Research (2015), o mercado global de medicamentos botânicos e derivados de plantas foi avaliado em US \$ 23,2 bilhões em 2013 e US \$ 24,4 bilhões em 2014. Espera-se que este mercado total atinja cerca de US \$ 35,4 bilhões em 2020, com uma taxa de crescimento anual composta de 6,6% 2015-2020. Segundo a Associação Brasileira de Empresas do Setor Fitoterápico, não existem dados oficiais sobre o tamanho desse mercado no Brasil (CARVALHO et al., 2008). A estimativa é que este comércio seja na ordem de 5% do total de medicamentos, o que corresponde a mais de US\$ 400 milhões/ano (BRUNING et al., 2012). Os pesquisadores acreditam que o país, por possuir a maior biodiversidade do planeta, deveria ter um papel de liderança nessa área (TERRA JUNIOR et al., 2015).

2. Considerações sobre a família Fabaceae

Considerada uma das maiores entre as Angiospermas tanto em número de gêneros e espécies quanto em importância econômica. Esta família descrita por Antoine Laurent de Jussieu abrange 19.325 espécies distribuídas em 727 gêneros (DI STASI & HIRUMA-LIMA, 2002; LEWIS et al., 2005). No Brasil, foram registradas 2.735 espécies e 212 gêneros (31 endêmicos), sendo abundantes em quase todos os biomas e ecossistemas do país (ANDRADE et al., 2009; LIMA et al., 2010). São encontradas em praticamente todas as formações vegetais do planeta, embora o atual centro de endemismo da família seja a região neotropical (LAVIN et al., 2004; FERNANDES & GARCIA, 2008). O aparelho vegetativo desta família é muito variável. Apresentam-se como ervas anuais ou perenes, eretas, prostradas, difusas, trepadeiras, subarbustos, arbustos e árvores de pequeno, médio ou grande porte (LEWIS, 1987; FERNANDES et al., 2011). Seu valor econômico é significativo pois é uma das mais

importantes famílias de plantas produtoras de alimentos, além de serem fonte de corantes, madeira e plantas ornamentais (AGUIAR et al., 2010). A família Fabaceae além de apresentar propriedades medicinais possui espécies produtoras de azeite e inseticidas, fixadoras de nitrogênio, dentre outras funções (DALARMI et al., 2015).

3. O gênero *Dalbergia*

De acordo com Mendes et al. (2012), esse gênero possui cerca de 100 espécies de árvores, arbustos e lianas (cipós e trepadeiras). No Brasil ocorrem 40 destas espécies, as quais são distribuídas em praticamente todos os ecossistemas, destacando-se as vegetações de Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica e Campo Rupestre (CARVALHO, 1997).

No gênero *Dalbergia* estão importantes árvores tropicais de madeira de lei, valorizadas pela sua madeira decorativa e, muitas vezes perfumadas, ricas em óleos aromáticos, que apresentam modo de dispersão de sementes principalmente pelo vento. Entretanto, em algumas espécies, o modo de dispersão é através da capacidade de flutuação dos frutos (ROUT et al., 2003; ARESI, 2011).

Um exemplo de espécies de árvores desse gênero de importância econômica são os jacarandás que são utilizados para montagem de móveis e instrumentos musicais devido à alta durabilidade de suas madeiras (MENDES et al., 2012). Além disso, o tronco de algumas espécies, tal como a *D. odorifera*, faz parte da tradicional medicina chinesa (SONGSIANG et al., 2009).

Embora conhecido por seu valor madeireiro, o gênero *Dalbergia* tem ampla aplicação na medicina popular. Diante disto, estudos realizados a partir de extratos variados de diversas partes das plantas têm identificado vários constituintes químicos, dentre estes destacam-se principalmente os isoflavonóides (NEUWINGER, 2000; HOU et al., 2011; KAZEMBE et al., 2012; SAHA et al., 2013), e comprovado diversas atividades biológicas, como apresentado na Tabela 1.

Tabela 1. Constituintes e atividades biológicas de algumas espécies do gênero *Dalbergia* relatados na literatura.

| Espécie | Parte (Extrato) | Compostos | Classificação dos Compostos | Atividade | Referência |
|----------------------|--|---|---|--|---|
| <i>D. sisso</i> | Flor (EtOH) Folha (EP) Vagens Maduras(EP) Cerne (EtOH) | Tectorigenina Sissotrina Isocaviudina Dalbergenone | Isoflavona Glicosídeo Glicosídeo Quinona | Analgésica, Antiinflamatória, Antidiarreica, Antipirética, Larvicida e repelente. | BANERJEE et al. (1963); BANERJEE et al. (1966); SHARMA et al. (1980); AHLUWALIA & SESHADRI (1963); HAJARE et al. (2001); BRIJESH et al. (2006); ANSARI et al. (2000). |
| <i>D. odorifera</i> | Cerne (EtOH) | Formononetina 3-Hidroxi Daidzeina Violanona Sativone Butin Dalbergina Pinocembrina Liquiritigenina Isoliquiritigenina | Isoflavona Isoflavona Isoflavona Isoflavona Flavonona Neoflavonóide Flavona Flavona Flavona | Antiinflamatória Antiplaquetária Antibacteriana | YAHARA et al. (1989); LEE et al. (2009); TAO & WANG (2010) WANG et al. (2014). |
| <i>D. volubilis</i> | Flores (EtOH) Galho jovem (EtOH) | Biochanina A Genisteina Daidzeina Volubolina Volubilina Isovolubilima | Isoflavona Isoflavona Isoflavona Neoflavonóide Glicosídeo Glicosídeo | Antiinflamatória Antiartrite | CHAWLA et al. (1974); HYE & GAFUR (1975); |
| <i>D. parviflora</i> | Cerne (EP) | Latifolina Cearoína | Neoflavonoide Neoflavonoide | Antiplasmodium | MUANGNOICHAROEN & FRAHM (1982); SONGSIANG et al. (2009) |

EtOH: etanol; EP: éter de petróleo; HEX: hexano; MeOH: metanol; AE: acetato de etila; BEN: benzeno

FONTE: Elaborada pela autora (2015 e 2016).

Tabela 1. Constituintes e atividades biológicas de algumas espécies do gênero *Dalbergia* relatados na literatura (Continuação).

| Espécie | Parte (Extrato) | Compostos | Classificação dos Compostos | Atividade | Referência |
|-------------------------|---|------------------------------------|-----------------------------|--|--|
| <i>D. ecastaphyllum</i> | Cerne (HEX) Entrecasca (EtOH) | Duartina | Isoflavona | Antioxidante Antifúngica Leishmanicida | MATOS et al. (1975); DONNELLY et al. (1973); SILVA et al. (2008); Araújo (2014). |
| | | Vesitol | Isoflavona | | |
| | | Daidzeina | Isoflavona | | |
| | | 8-Demethylduartin | Isoflavona | | |
| | | Medicarpina | Isoflavona | | |
| | | 3-Hydroxy-8,9-dimethoxypterocarpan | Isoflavona | | |
| | | Formononetina | Isoflavona | | |
| | | Isoliquiritigenina | Flavona | | |
| <i>D. frutescens</i> | Casca (MeOH/HEX; AE; EtOH) | Biochanina A | Isoflavona | Antigiardia | KHAN et al. (2000) |
| | | Fomononetina | Isoflavona | | |
| | | Gliciteina | Isoflavona | | |
| | | Odoratina | Isoflavona | | |
| <i>D. miscolobium</i> | Cerne (BEN) Folhas (HEX) Galho (AE) | Castanina | Isoflavona | Inibição enzimática | GREGSON et al. (1978); SILVA (2013) |
| | | Violastirene | Cinamil fenóis | | |
| | | Isoviolastirene | Cinamil fenóis | | |
| | | Prunetina | Isoflavona | | |
| | | Duartina | Isoflavona | | |
| <i>D. nigra</i> | Cerne (MeOH) | Sativan | Isoflavona | Dermatite de contato | KITE et al. (2010); HAUSEN (1982) |
| | | Dalnigrina | Neoflavonóide | | |
| | | Caviunina | Isoflavona | | |
| | | 4-methoxydalbergione | Neoflavonóide | | |

EtOH: etanol; EP: éter de petróleo; HEX: hexano; MeOH: metanol; AE: acetato de etila; BEN: benzeno
 FONTE: Elaborada pela autora (2015 e 2016).

De acordo com o Centro Nordestino de Informações sobre Plantas (CNIp, 2016) (), no Nordeste brasileiro as espécies identificadas do gênero *Dalbergia* são: *D. acuta*, *D. catingicola*, *D. cearenses*, *D. decipularis*, *D. ecastaphyllum*, *D. foliolosa*, *D. frutescens* (Vell.) Britton var. *frutescens*, *D. frutescens* (Vell.) Britton var. *tomentosa* (Vogel) Benth, *D. glaucescens*, *D. hortensis*, *D. miscolobium* e *D. nigra*. Dentre as espécies mais estudadas estão a *D. sissoo*, *D. odorifera*, *D. volubilis* e *D. parviflora*.

Existem poucos estudos com a *D. ecastaphyllum* tanto do ponto de vista químico como farmacológico. Entretanto, esta espécie, popularmente conhecida no estado de Sergipe como rabo de bugio, tem despertado interesse, pois foi a ela atribuída a origem botânica da própolis vermelha brasileira (DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008; JAIN et al., 2014). Estudos tem demonstrado que a própolis brasileira é uma rica fonte de compostos bioativos e por isso tem atraído interesses científicos e econômicos (ALENCAR et al., 2007; SILVA et al., 2008; CABRAL et al., 2009; LÓPEZ et al., 2014). É importante identificar a origem e o marcador botânico pois, dependendo da natureza química da própolis e sua similaridade com a resina encontrada na vegetação visitada pela abelha, poder-se-ia extrair compostos bioativos da própria espécie botânica ao invés de utilizar a própolis como fonte primária.

4. *Dalbergia ecastaphyllum*

Várias sinonímias são encontradas para essa espécie dentre elas: *Hedysarum ecastaphyllum* (L.), *Pterocarpus ecastaphyllum* (L.), *Ecastaphyllum ecastaphyllum* (L.) Britton, *Amerimnon ecastaphyllum* (L.) Standl e *Ecastaphyllum molle* Miq. (CARVALHO, 1997; FRANCIS, 2004). Segundo Aresi (2011), existem duas correntes distintas em relação à grafia de *D. ecastaphyllum*, visto que encontram-se na literatura informações sobre *D. ecastaphyllum* e *D. ecastaphyllum* e, ambas representam a mesma espécie. Segundo Mata et al. (2014), a maneira correta de referenciar é *D. ecastaphyllum* (Figura 1).

Assim como possui várias sinonímias, a *D. ecastaphyllum* também possui diversos nomes populares, dentre eles: Rabo de bugio, Bugi, Rabo de macaco, Marmelo, Marmelo do mangue, Marmeleiro da praia, Feijão de guaiamum, Arco de barril, Moeda de videira, Verônica, Verônica branca, entre outros (DONELLY et al., 1973; FRANCIS, 2004; TAROLA et al., 2007; SILVA et al., 2008; PICCINELLI et al., 2011).

Figura 1: Espécime de *D. ecastaphyllum* coletada na região do baixo São Francisco



FOTO: A autora (2013 e 2014).

Segundo Mata et al. (2014), a área de ocorrência da *D. ecastaphyllum* (L.) Taub é muito vasta, e se estende desde o sul da Flórida (EUA) ao sul do Brasil, assim como na costa ocidental da África. No Brasil, tem como domínios fitogeográficos a Amazônia e a Mata Atlântica, em áreas influenciadas pelo mar, como manguezal e restinga, reunindo um emaranhado de raízes, ramos e caules que auxiliam na fixação da areia (MATA et al., 2014). Sua distribuição no Brasil abrange as regiões Norte (Roraima, Pará e Amazonas), Nordeste (Maranhão, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas e Sergipe), Centro-Oeste (Mato Grosso do Sul), Sudeste (Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro) e Sul (Paraná e Santa Catarina) (CARVALHO, 1997; SILVA & SANTOS, 2009; LIMA, 2012).

Devido ao padrão de distribuição no ambiente, áreas ocupadas por *D. ecastaphyllum* podem registrar uma perda de riqueza e diversidade de espécies, pois formam um emaranhado bastante sombreado que pode chegar a seis metros de altura com elevada densidade sendo praticamente impenetrável a luz (REYS & CANTILLO, 2003). Porém, apesar da perda da riqueza vegetal, o grande sombreamento fornecido por *D. ecastaphyllum* pode ser benéfico ao diminuir a intensa radiação solar, altas temperaturas, ação dos ventos e níveis de transpiração (BOHRER et al., 2009). Esta espécie é muito utilizada na recuperação de áreas degradadas em ambientes alagáveis e recuperação de populações naturais de espécies ameaçadas sobretudo de restinga e manguezais (BOHRER et al., 2009; SILVA & SANTOS, 2009).

De acordo com Aresi (2011), *D. ecastaphyllum* possui crescimento moderado e constante. Adaptada a condições de alta salinidade, seus frutos são capazes de flutuar devido a sua forma alada; porém por possuírem haste frágeis sua madeira não é adequada para utilização (FRANCIS, 2004). Esta espécie cresce em locais em que há constante vaporização

de sal e em solos moderadamente salinos, onde indivíduos mais velhos tendem a formar densas moitas (ARESI, 2011).

Por possuírem substâncias químicas capazes de entorpecer, os índios americanos utilizavam as cascas e as raízes na pesca. Para o tratamento de várias debilidades, no Senegal, as folhas são utilizadas em inalações e banhos (FRANCIS, 2004). Apesar de poderem apresentar toxicidade para alguns tecidos, os extratos dessa planta são utilizados na medicina tradicional. Segundo Guedes et al. (2014), suas raízes e cascas são utilizadas tradicionalmente para combater inflamação do útero e anemia.

Como citado anteriormente, a *D. ecastaphyllum* é uma planta de uso corrente na medicina popular. Em estudo realizado na comunidade pesqueira de Algodual, estado do Pará, das 24 espécies da restinga com valor medicinal citadas, oito foram destacadas como importância cultural e com fins terapêuticos, entre elas a espécie em questão (ROMAN & SANTOS, 2006).

Estudos relatam que os principais constituintes da *D. ecastaphyllum* são os isoflavonóides, dentre eles estão: liquiritigenina, daidizeína, dalbergina, isoliquiritigenina, formononetina, biochanina A, medicarpina e 3-hidróxi-8,9-dimetóxipterocarpana, sendo este último considerado constituinte majoritário (DONNELLY et al., 1973; MATOS et al., 1975; DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008). Segundo Matos et al. (1975) foi identificado anetol, estragol, sitosterol, formononetina, (+)-mucronulatol (1a, 2a) e (3R)-S-de-Omethylduartin (2b), sitosterol, isoliquiritigenin, (2S)-liquiritigenin, formononetina, a daidzeína, (-t) - e (6aS, 1 LAS)- demethylhomopterocarpin (3-A), (3S)-vestitol (1b) em amostras dessa espécie coletadas na Nigéria e no Brasil.

Com a valorização da própolis vermelha na região Nordeste do Brasil, é cada vez mais recorrente o registro da presença de *D. ecastaphyllum* que tem sua ocorrência ao longo da zona litorânea e região de mangue. Silva et al. (2008) analisaram o perfil químico dos extratos de *D. ecastaphyllum* e da própolis vermelha e constataram que ambos demonstram ter constituintes semelhantes, sendo os principais compostos os isoflavonóides medicarpina e 3-hidróxi-8,9-dimetóxipterocarpana.

5. *Dalbergia ecastaphyllum* e a Própolis vermelha brasileira

No Brasil, devido aos diferentes biomas existentes, há uma variedade de tipos específicos de própolis com variações de cor e que possuem propriedades biológicas diversas a depender das características das espécies vegetais fornecedoras de resina (LUSTOSA et al., 2008). Uma vez que as abelhas coletam resinas de diferentes fontes vegetais, Mata (2014)

afirma que apesar das possíveis diferenças na sua composição, as amostras de própolis são consideradas similares em toda sua natureza química.

Estudos afirmam que a composição química da própolis depende da sazonalidade e de sua origem botânica (SFORCIN et al., 2001; BANKOVA et al., 2000). Própolis da zona temperada é geralmente composta com 50-60% de resinas e bálsamos, 30-40% de cera, 5-10% de essência e óleos aromáticos, 5% de pólen, e 5% de outras substâncias, como ácidos alifáticos, ésteres, ácidos aromáticos, ácidos graxos, carboidratos, aldeídos, amino ácidos, cetonas, chalconas, diidrochalconas, terpenóides, vitaminas (B1, B2, B6, C e E) e minerais (ALMEIDA & MENEZES, 2002). A própolis proveniente de regiões tropicais contém flavonóides, di e triterpenos, lignina e outras substâncias fenólicas, ácido prenil-p-cumárico, acetofenonas, açúcares, açúcares-álcoois, ceras, vitaminas e minerais. Também são encontrados vários compostos voláteis como monoterpenos e sesquiterpenos (BANKOVA et al., 1994). Segundo Marcucci & Bankova (1999), na própolis brasileira os maiores componentes são terpenoides e derivados prenilados do ácido p-cumárico.

Moraes et al. (2010) afirmaram que a própolis brasileira é classificada em 13 grupos com base na cor, textura, características físico-químicas e principalmente quanto às atividades biológicas. Essa variedade é facilmente explicada pela biodiversidade do país. Destes, dois grupos se destacam: a própolis verde (Grupo 12) produzida na região sudeste a partir das folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* e a própolis vermelha (Grupo 13) produzida na região nordeste a partir de exsudatos do caule de *D. ecastaphyllum* (DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008; MORAES et al., 2010; JAIN et al., 2014).

Segundo López & Sawaya (2012), as própolis vermelhas são encontradas em diferentes áreas geográficas como: China, México, Cuba, Venezuela e na costa do nordeste do Brasil (Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia). Devido a estas diversas origens, os perfis químicos são variados, tornando necessário estudos para caracterizar os diferentes tipos de própolis vermelha. Do mesmo modo, poucos trabalhos são descritos na literatura sobre a espécie *D. ecastaphyllum*, tanto do ponto de vista químico, quanto farmacológico. Mais estudos são necessários para determinar os principais marcadores químicos da própolis vermelha brasileira ou se existem tipos diferentes dela e como a época e região podem afetar sua composição (LÓPEZ & SAWAYA, 2012).

Estudos que analisaram amostras de própolis vermelha e *D. ecastaphyllum* identificaram compostos químicos, em sua maioria isoflavonóides, em ambas as amostras (Tabela 2), o que corroborou para a afirmação de que essa espécie vegetal é uma fonte de

resina para a produção de própolis vermelha (DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008). Os isoflavonóides estão presentes apenas em poucas espécies do reino vegetal quase que exclusivamente na família Fabaceae (LÓPEZ & SAWAYA, 2012). Jain et al. (2014) utilizando sequenciamento de DNA verificaram que a origem botânica da própolis vermelha sergipana tem como componente a *D. ecastaphyllum*.

Tabela 2. Compostos descritos presentes na *D. ecastaphyllum* e na própolis vermelha brasileira até o ano de 2015.

| Classificação dos Compostos | Compostos | Referência |
|-----------------------------|--------------------------------------|---|
| Isoflavona | Medicarpina | SILVA et al. (2008) |
| Isoflavona | 3-hidróxi-8,9-dimetóxipterocarpana | |
| Fenol | Acido ferúlico | SILVA et al. (2008) |
| Flavona | Crisina | |
| Flavonol | Rutina | DAUGSCH et al. (2008); BECHO et al. (2009); ARESI (2011). |
| Isoflavona | Liquiritigenina | |
| Isoflavona | Daidzeina | |
| Diidroflavonol | Pinobanksina | |
| Flavonol | Quercetina | |
| Flavona | Luteolina | |
| Isoflavona | Dalbergina | |
| Isoflavona | Isoliquiritigenina | |
| Isoflavona | Formononetina | |
| Flavona | Pinocembrina | |
| Flavonona | Pinobanksin-3-acetato | |
| Isoflavona | Biochanin A | |
| Isoflavona | Neovestitol | PICCINELLI et al. (2011); BECHO et al. (2009). |
| Flavonona | Naringenina | |
| Isoflavona | Vestitol | |
| Isoflavona | 7-O-metilvestitol | |
| Flavonoide | Homopterocarpin | |
| Flavonoide | Vesticarpan | |
| Isoflavona | 3,8-dihydroxy-9-methoxy-pterocarpan | |
| Isoflavona | 3,4-dihydroxy-9-methoxy-pterocarpan | |
| Isoflavona | 3-hydroxy-8,9-dimethoxy-pterocarpan | |
| Isoflavona | 7,30-dihydroxy-50-methoxy-isoflavone | |

FONTE: Elaborada pela autora (2015 e 2016).

Em contrapartida, Dausch et al. (2008) afirmaram que a própolis é uma mistura complexa de substâncias resinosas coletadas pelas abelhas (*Apis mellifera*) de várias fontes vegetais. Esta afirmação é confirmada por diversos estudos, em que foram identificados na própolis vários compostos químicos que não foram encontrados na espécie tida como origem botânica desta mistura, conforme demonstra a Tabela 3. Isto corrobora com o estudo de López & Sawaya (2012) onde é inferido que provavelmente há outras fontes botânicas para própolis vermelha brasileira visto que muitos compostos identificados no produto apícola não foram detectados na *D. ecastaphyllum*.

Tabela 3. Compostos descritos na própolis vermelha de várias localidades que não foram encontrados em *D. ecastaphyllum* até o ano de 2015.

| Classificação dos Compostos | Compostos | Referência |
|-----------------------------|----------------------------------|---|
| Flavonol | Catequina | MENDONÇA et al. (2015a); BECHO et al. (2009). |
| Flavonol | Epicatequina | |
| Fenol | Galato de Propila | |
| Phenylpropene derivates | 1-Methoxy-4-(1-propenyl)-benzene | ALENCAR et al. (2007). |
| Phenylpropene derivates | Methoxyeugenol | |
| Aromatic hydrocarbons | Benzoic acid | |
| Isoflavonoide | 4,7-Dimethoxy-2-isoflavonol | |
| Isoflavona | 7,4-Dihydroxyisoflavone | |
| Fenol | 2,4,6-Trimethylphenol | |
| Fenol | <i>m</i> -Guaiacol | |
| Terpeno | Methyl abietate | |
| Hidrocarbono aromatico | Acido benzoico | RIGHI et al. (2011) |
| Fenol | Acido fenolico | |
| Flavonoide | 2-hydroxy-4methoychalcone | |
| Terpeno | Anisylacetona | TRUSHEVA et al. (2006) |
| Flavonoide | Isosativan | |
| Tri terpeno | Cicloartenol | |
| Tri terpeno | Lupeol | LOTTI et al. (2010) |
| Flavonoide | 7-hydroxyflavanone | |
| Flavonoide | (2S)-naringenina | AWALE et al. (2008) |
| lignina | Pinoresinol dimetil eter | |
| lignina | Pinoresinol | |
| monoterpeno | Limonene | NUNES et al. (2009) |
| monoterpeno | p-cymene | |
| sesquiterpeno | Farnesene | |
| sesquiterpeno | Isocariophyllene | |

FONTE: Elaborada pela autora (2015 e 2016).

6. Identidade Genética

A importância econômica e ecológica das leguminosas é excepcionalmente alta porque são fontes de alimento, forragem, madeiras, medicamentos, entre outros (VATANPARAST et al., 2013). Entender a história evolutiva das espécies é um fator fundamental para avaliação da biodiversidade e definição de prioridades de conservação (PURVIS & HECTOR, 2000).

Segundo Rao (2004), a determinação da variabilidade genética entre as espécies pode ser determinada utilizando marcadores morfológicos (fenótipo), bioquímicos (proteínas) e moleculares (DNA). Entretanto, os morfológicos são intensamente afetados por fatores ambientais, bem como os bioquímicos também podem sofrer influência da sazonalidade. Todavia, as limitações associadas com os marcadores bioquímicos e morfológicos são ultrapassadas por meio de marcadores moleculares que independem da influência do meio ambiente (ALAM et al., 2015).

Historicamente, a análise sistemática e filogenética de plantas aromáticas é baseada em características morfológicas. Uma indicação de descendência comum pode ser a ocorrência ou não de metabólitos secundários que muitas vezes são semelhantes entre espécies do mesmo gênero (FIGUEIREDO et al., 2007).

Estudos demonstram que a variação na composição química dos óleos essenciais está correlacionada com os dados genéticos nas espécies *Thymus vulgaris*, *Cunila galioides*, *Salvia fruticosa* e *Ocimum gratissimum* (SKOULA et al., 1999; VIEIRA et al., 2001; ECHEVERRIGARAY et al., 2001; ECHEVERRIGARAY et al., 2003). Jain et al. (2014) ao analisarem amostras de própolis vermelha e *D. ecastaphyllum* coletadas no estado de Sergipe concluíram que abordagem molecular utilizada (sequenciamento de DNA) é uma importante ferramenta para identificação da origem botânica do produto apícola. Ganopoulos et al. (2015) afirmaram que as sequências de DNA fornecem uma ferramenta útil para a investigação da variação genética entre as espécies auxiliando na identificação ou classificação taxonômica.

Dentre as diversas ferramentas biotecnológicas disponíveis, os marcadores moleculares tem desempenhado papel fundamental para a detecção de polimorfismo genético. O número destes marcadores passou a ser virtualmente ilimitado, podendo ser obtido em qualquer organismo vivo e a sua utilização ampliada para a grande maioria das espécies (TOPPA & JADOSKI, 2013). Define-se por marcador molecular toda e qualquer característica molecular correspondente a regiões expressas ou não do genoma. Estes permitem diferenciar a variabilidade existente entre dois indivíduos ao longo da molécula de

DNA (FERREIRA & GRATTAPAGLIA, 1998). Tais marcadores podem ser utilizados em variadas aplicações, tanto no estudo de diversidade genética das espécies como na prática de melhoramento de plantas (TOPPA & JADOSKI, 2013).

Os marcadores moleculares podem ser classificados em dois grupos, conforme a metodologia utilizada para identificação: hibridização ou amplificação do DNA via reação em cadeia da DNA polimerase (PCR). Esta última, tem sido a mais utilizada e se baseia na amplificação de fragmentos específicos de DNA, delimitados por primers (iniciadores) onde os produtos desta reação podem ser identificados (MARCELINO et al., 2007).

De acordo com Heather & Chain (2016), no último meio século foi investido tempo e recurso para desenvolver e melhorar as tecnologias de sequenciamento do DNA. Segundo Carvalho & Silva (2010), a comercialização das tecnologias de sequenciamento de DNA de nova geração iniciou em 2005 e estas estão evoluindo rapidamente. Essas tecnologias promovem o sequenciamento de DNA em plataformas capazes de gerar informação sobre milhões de pares de bases em uma única corrida (O'RAWE et al., 2015).

Por evoluir rapidamente as regiões ITS (Internal Transcribed Spacer) se destacam, representando uma ferramenta apropriada para reconstruir a filogenia molecular de plantas (FANTACCIONE et al., 2008). Estas regiões (ITS1 e ITS2) se encontram entre as regiões codificantes do DNA ribossomal 18S e 26S e tem sido proposta como potenciais códigos de barras (DNA barcoding) (CHEN et al., 2010). Entre esses espaçadores há ainda uma região conservada 5.8S. Os primers utilizados nas regiões flangeadoras conservadas 18S e 26S são os ITS5 e ITS4 respectivamente, e estas sequências foram produzidas para amplificar a região ITS completa, ou seja, ITS1, 5.8S e ITS2 (LI et al., 2011).

Gao et al. (2010) analisaram diferentes códigos de barra de DNA de plantas medicinais da família Fabaceae em que observaram que a região ITS2 obteve 80% de sucesso em nível de espécie e 100% em nível de gênero. Entretanto, esse estudo não incluiu *Dalbergia*. Phong et al. (2014) analisaram oito espécies de *Dalbergia* do Vietnã e com base na análise de UPGMA e diversidade de nucleotídeos inferiram que a utilização do locus ITS tem potencial para ser utilizado como código de barras.

Trabalho pioneiro realizado por Vatanparast et al. (2013) analisou 64 espécies de *Dalbergia* de diferentes localidades (Américas, África e Ásia) utilizando a região ITS, com objetivo de descrever uma estrutura filogenética a nível de espécie para este gênero que foi incluído no estudo evolutivo da Fabaceae. Os resultados demonstraram que a região ITS fornece sinal filogenético suficiente entre as espécies de *Dalbergia*.

Na literatura, pouca informação está disponível sobre a taxonomia molecular do gênero *Dalbergia* e, principalmente, da espécie *D. ecastaphyllum*, tornando-se necessário a realização de estudos sobre o gênero em vários aspectos, incluindo filogenia e diversidade usando sequências de DNA e polimorfismo com base em sequências de regiões genômicas adequadas.

Bhagwat et al. (2015), com objetivo de desenvolver um método de identificação preciso para espécies do gênero *Dalbergia* selecionaram quatro loci (rbcL, matK, trnH – psbA e nrITS) e utilizaram vários parâmetros estatísticos para demonstrar o potencial como códigos de barras para discriminar de forma inequívoca espécies de *Dalbergia*. Neste estudo, a região nrITS apresentou alta variação intraespecífica, o que justifica também o seu uso no nível populacional, mas que precisa ser confirmado com uso de sequências adicionais de outras regiões do DNA.

7. Marcadores químicos

Segundo Rasheed et al. (2012) pesquisas que correlacionem dados de impressões digitais de DNA com a quantidade de marcadores químicos selecionados nas plantas, podem ter amplas aplicações em controle de qualidade de matérias-primas. Os marcadores químicos são definidos como constituintes quimicamente conhecidos ou grupo de constituintes de um medicamento à base de plantas que servem para fins de controle de qualidade, independente da atividade terapêutica que possuem (TAPPIN & LUCCHETTI, 2007). De acordo com Li et al. (2008), um marcador químico ideal deve ser o único componente que contribui para os efeitos terapêuticos de um medicamento a base de plantas. No entanto, para a maioria dos fitoterápicos, os componentes terapêuticos não foram completamente elucidados ou facilmente monitorado.

Estudos demonstram que existe uma variedade de aplicações para os marcadores químicos como: identificação de adulterantes, diferenciação de medicamentos fitoterápicos a partir de múltiplas fontes, determinação da melhor época de coleta das espécies vegetais, avaliação de métodos de processamento, diagnóstico de ingredientes tóxicos, entre outros. Entretanto, existem muitas dificuldades técnicas na produção de marcadores químicos como: temperatura, luz e solventes que podem causar a degradação e/ou transformação de componentes purificados; isômeros e conformações que modificam os compostos (LI et al., 2008; RASHEED et al., 2012).

As propriedades medicinais das espécies vegetais são atribuídas aos compostos bioativos que devem ser identificados e quantificados. Estes podem ser utilizados como

marcadores químicos para avaliações quali e quantitativas. No entanto, compostos marcadores não precisam necessariamente ser ativos (RASHEED et al., 2012). De acordo com Guaadaoui et al. (2014) um composto bioativo tem a capacidade e habilidade de interagir com um ou mais componentes do tecido vivo apresentando uma ampla gama de efeitos prováveis. Ou seja, é simplesmente uma substância que tem uma atividade biológica. Esses compostos variam muito em termos de estrutura e função química. Em sua maioria são compostos fenólicos (principalmente os flavonoides), terpenos, glicosídeos, entre outros, que estão presentes em todas as plantas e têm sido extensivamente estudadas (KRIS-ETHERTON et al., 2002; RASHEED et al., 2012).

Os fenólicos são metabólitos secundários amplamente distribuído em tecidos de plantas que apresentam grande diversidade estrutural e química sendo classificados em: simples (presente na maioria das frutas e vegetais frescos), ou complexos (presentes em casca, raízes e folhas de plantas) (WATERMAN & MOLE, 1994; COHEN et al., 2010; MARTÍ et al., 2015). Quideau et al. (2011), em seu artigo de revisão, realizaram um estudo sobre as propriedades químicas e estruturais de várias famílias de fenólicos relacionando com as propriedades biológicas. Dias et al. (2016) afirma que as propriedades bioativas dos compostos fenólicos são muito bem conhecidas com descrições detalhadas de suas características biológicas. Estudos comprovam que os compostos fenólicos apresentam várias atividades biológica, tais como: antiinflamatória, antimicrobiana, antioxidante, anticancerígenas, antitrombóticos, entre outras. Possuem também a capacidade de servir como conservantes de alimentos naturais (ABEROUMAND & DEOKULE, 2008; QUIDEAU et al., 2011; CAROCHO & FERREIRA, 2013).

Dentre os compostos fenólicos o maior grupo é constituído pelos flavonoides que são metabólitos secundários distribuído nas folhas, sementes, cascas e flores de plantas (BALASUNDRAM et al., 2006). Uma grande variedade foi identificada sendo as maiores classes os flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavona, diidroflavonois e chalconas (BECHO et al., 2009). Segundo Harbone e Willams (2000), nas plantas, os flavonoides apresentam funções de proteção contra a radiação ultravioleta, patógenos e herbívoros. Esta classe fitoquímica foi intensamente investigada e vários estudos demonstram inúmeras propriedades farmacológicas importantes como: atividade antioxidantes (KRISHNAIAH et al., 2011), vasodilatadoras (PEREZ et al., 2014), anti-inflamatórias (RAO et al., 2005), anticarcinogênica, antivirais (MIDDLETON et al., 2000), cardioprotetoras (TESTAI et al., 2013), entre outras.

Estudos demonstraram que a própolis vermelha do estado de Alagoas e a resina da *D. ecastaphyllum* apresentam perfil químico idêntico. Dentre os compostos encontrados nestas pesquisas, foram identificados dois flavonoides e um ácido fenólico que são considerados marcadores químicos de outros tipos de própolis e dois isoflavonóides nunca antes relatados em amostras de própolis. Estes novos compostos foram considerados marcadores químicos da própolis vermelha brasileira (SILVA et al., 2008; ALENCAR et al., 2007).

Daugusch et al. (2008) identificaram como os principais compostos presentes em amostras de própolis vermelha brasileira (Bahia, Sergipe, Alagoas, Pernambuco e Paraíba) a isoliquiritigenina, formononetina e pinocembrina. Awale et al. (2008) conseguiram isolar 41 compostos a partir de amostras de própolis vermelha do litoral sul da Paraíba. Cabral et al. (2009) encontraram níveis elevados de compostos fenólicos em amostras de própolis vermelha de Alagoas. Lotti et al. (2010) afirmaram que plantas do gênero *Dalbergia* apresentam os mesmos compostos principais que a própolis vermelha mexicana. Oldoni et al. (2011) relataram em sua pesquisa que vestitol, neovestitol e isoliquiritigenina são compostos bioativos da própolis vermelha do estado de Alagoas.

Piccinelli et al. (2011), analisando a própolis vermelha e sua origem botânica proveniente de diferentes regiões tropicais, inferiram que os flavonoides encontrados em ambas as amostras poderiam ser utilizados como marcadores químicos para avaliação e controle de qualidade do produto apícola. A informação química obtida possibilitou a correta compreensão das semelhanças e diferenças entre as amostras coletadas. López et al. (2014), analisando a *D. ecastaphyllum* e a própolis vermelha de Sergipe, mediante comparação utilizando técnicas cromatográficas, identificaram a biochanina A, a formononetina e a pinocembrina e, confirmaram que estes compostos são marcadores químicos dessas amostras.

Para produção e padronização de extratos bioativos é necessário realizar análises cromatográficas com base nos princípios ativos ou compostos principais. Dentre os diversos tipos de cromatografia, as mais utilizadas são: HPLC (High Performance Liquid Chromatography), UHPLC (Ultra High Performance Liquid Chromatography) e GC (Gas Chromatography). Estas análises instrumentais são rotineiramente utilizadas para confirmar a autenticidade dos compostos (RASHEED et al., 2012).

8. Métodos cromatográficos para determinação de compostos bioativos

O uso frequente de produtos naturais despertou o interesse dos pesquisadores em identificar e quantificar os compostos neles existentes na tentativa de chegar a uma padronização. Estas análises são comumente realizadas utilizando métodos cromatográficos

(MEDIC-SARIC et al., 2004). A cromatografia é uma técnica analítica baseada na separação de moléculas, devido a diferenças em sua estrutura e/ou composição, através de um sistema composto por uma fase estacionária e uma móvel. A afinidade e interação da amostra com o sistema estacionário conduzirá a separação dos compostos, ou seja, as moléculas com interações mais fortes com a fase estacionária se moverá mais lentamente através da coluna do que as com interações mais fracas (KUPIEC, 2004).

Para identificar um grupo de compostos utilizando métodos cromatográficos, é necessário dispor de um conjunto de substâncias padrão para a comparação dos resultados da análise do composto desconhecido. Além disso, um problema comum é encontrar o melhor sistema cromatográfico para realizar a análise, ou seja, para se obter a separação ótima e identificação do nomeadamente grupo de compostos (MEDIC-SARIC et al., 2004).

A depender da complexidade da amostra, diferentes técnicas cromatográficas podem ser utilizadas, como: HPLC, UHPLC, GC, entre outras. Segundo Sawaya et al. (2011) a busca por métodos mais rápidos que sejam capazes de caracterizar amostras de própolis de diferentes origens geográficas tem levado ao uso de técnicas cromatográficas acopladas a espectrometria de massa.

No que diz respeito à identificação de substâncias ativas, são combinadas outras técnicas devido à rapidez, eficiência e reprodutibilidade como: espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa (GC-MS) e a cromatografia líquida de alta eficiência ou ressonância magnética nuclear (YUNES & CALIXTO, 2001).

Entre estes métodos, o mais amplamente utilizado para separar e quantificar compostos é o RP-HPLC (reversed-phase high performance liquid chromatography) acoplado com UV-Vis com detecção de massa (LC- MS) ou espectrometria de massa (LC - MS/MS) (BARROS et al., 2012; DE PAEPE et al., 2013). Este método é aplicado como uma ferramenta incisiva para o controle de qualidade de medicamentos à base de plantas. Porém, muitas melhorias vêm sendo incorporadas a esta técnica nos últimos anos na tentativa de permitir que análises mais rápidas e eficientes sejam alcançadas (MALDANER & JARDIM, 2012).

Segundo Kim et al. (2013) ensaios de HPLC vem sendo substituídos pelo método UHPLC devido à análise ser mais rápida. O UHPLC tem vantagens sobre o HPLC em termos de economia de tempo e solvente, desempenho e eficiência. Além disso, esse método demonstrou boa resolução, alta sensibilidade, menor volume de injeção de amostra e um curto tempo de análise que resultou em maior rendimento da amostra (KIM et al., 2013).

O UHPLC fundamenta-se nos mesmos princípios de separação do HPLC, tendo como principais diferenças as colunas cromatográficas empregadas que são de dimensões reduzidas, recheadas com partículas de fases estacionárias $\leq 2 \mu\text{m}$, as quais, juntamente com as altas velocidades lineares da fase móvel aumentam a resolução e a detectabilidade diminuindo o tempo das análises (MARTÍNEZ-HUÉLAMO et al., 2015).

Segundo López (2014), a técnica UHPLC acoplada à espectrometria de massas (UHPLC-MS) é um método moderno, rápido e sensível que permite avaliar os perfis químicos das amostras e determinar sua composição qualitativamente, mesmo sem padrões, comparando os espectros de massas (MS/MS) dos componentes das amostras com informações na literatura tornando-se a ferramenta mais adequada para a avaliação da composição de matrizes complexas como a própolis.

Como já foi citado, os pesquisadores utilizam constantemente análises cromatográficas para identificar a origem botânica dos diversos tipos de própolis brasileira. Por exemplo, Park et al. (2002) utilizaram HPLC e GC para analisar amostras de própolis brasileira de diferentes grupos (G3, G6 e G12) e resinas de diferentes plantas para identificar a origem botânica do produto apícola. Concluíram que os perfis cromatográficos confirmam a similaridade entre as amostras e suas origens botânicas sendo a do G3 proveniente da *Hyptis divaricata* e a do G6 e G12 *Baccharis dracunculifolia*.

Silva et al. (2008), ao analisar a própolis vermelha de Alagoas e a resina de *D. ecastaphyllum* a partir dos resultados do perfil químico obtido por HPLC, afirmaram que este material é um novo tipo de própolis brasileira definida como sendo do Grupo 13. Além disso, com base nos resultados de espectroscopia UV-VIS, RP - HPTLC, RP- HPLC e GC / MS concluíram que a resina da planta em estudo é a origem botânica da própolis vermelha. López et al. (2014), ao comparar amostras de própolis vermelha de diferentes localidades com a espécie vegetal *D. ecastaphyllum*, encontraram marcadores químicos comuns à própolis vermelha do estado de Sergipe e a planta em estudo.

Segundo Sharma & Janmeda (2014), os metabólitos secundários presentes nas plantas possuem propriedades químicas e farmacológicas interessantes para a saúde humana e, pesquisas a respeito desses compostos representam uma importante estratégia para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos.

O controle de qualidade destes produtos é muito desafiador pois, os componentes responsáveis pelas atividades terapêuticas desejadas são desconhecidas e não são encontrados em um único composto. Normalmente, as atividades biológicas dos extratos vegetais são

atribuídas a todos os compostos químicos presentes no extrato vegetal, chamado de compostos marcadores. Por isso, é recomendado o uso de impressões digitais cromatográfica para avaliar a complexidade e variabilidade de componentes químicos para melhorar a informação de controle de qualidade (PINTO et al., 2015).

9. Atividades biológicas

O estudo químico de produtos naturais tem como meta geralmente a busca por atividades biológicas. Os benefícios à saúde das plantas e produtos apícolas têm sido atribuídos aos compostos fenólicos que são onipresentes nas espécies vegetais, e agem, em diferentes processos fisiológicos exercendo variadas atividades biológicas, tais como: antioxidantes, antimicrobianos, antialérgicos, antiinflamatórios, efeitos cardioprotetores e vasodilatadores, entre outros (BALASUNDRAM et al., 2006; ABEROUMAND & DEOKULE, 2008; SALEEM et al., 2010; COSTA et al., 2014)

A definição para antioxidante vem sofrendo modificações com o passar dos anos. Por exemplo, Halliwell & Gutteridge em 1995 definiram como qualquer substância que, presente em baixas concentrações comparado ao substrato oxidável, reduz ou previne significativamente a oxidação deste substrato. Posteriormente, foi definido como: qualquer substância que atrasa, impede ou elimina os danos oxidativos para uma molécula alvo (HALLIWELL, 2007). Khlebnikov et al. (2007) definiram como qualquer substância que elimina diretamente os radicais livres ou age de forma indireta para regular as defesas antioxidantes ou inibe a produção destes radicais.

Também chamados de espécies reativas de oxigênio (ERO), os radicais livres são produzidos durante o metabolismo celular em sistemas vivos (ROY et al., 2011). De acordo com vários estudos, as ERO estão envolvidas na etiologia de várias doenças, tais como: aterosclerose, envelhecimento, câncer, doenças cardiovasculares, inflamação, doenças neurodegenerativas (Parkinson e Alzheimer) e intoxicação por etanol (BENZIE & STRAIN, 1996; RUSSO et al., 2002; MOEIN et al., 2008).

Segundo Quinming et al. (2010), os antioxidantes naturais demonstram grande potencial de defesa contra os danos causados as organelas celulares pelo estresse oxidativo induzido pelos ERO. Roy et al. (2011) investigaram uma variedade de plantas medicinais quanto a atividade antioxidante e concluíram que tanto os extratos brutos como os seus constituintes químicos individuais são mais eficazes (*in vitro*) do que os antioxidantes sintéticos. Isso demonstra a importância em identificar produtos naturais que possuam esta atividade.

Nagai et al. (2001) observaram a atividade antioxidante de amostras de mel, geleia real e própolis baseando-se no sistema de peroxidação lipídica. Utilizando o mesmo sistema, Nagai et al. (2003) verificaram alta atividade antioxidante para os extratos aquosos de própolis, sendo que em algumas concentrações essa atividade foi maior do que a do ácido ascórbico a 5 mM. A atividade de sequestro dos ERO destes extratos também foi alta, inibindo completamente a produção dos íons superóxidos e dos radicais hidroxila.

Moreno et al. (2000) evidenciaram que vários extratos etanólicos de própolis argentina demonstraram atividade anti-radicaís livres baseados na descoloração do radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl). A atividade antioxidante de extratos etanólicos de própolis de diversas regiões também foi comprovada por Kumazawa et al. (2004) pelas metodologias de descoloração do β -caroteno e do radical livre DPPH. Mendonça et al. (2015b) avaliaram o extrato etanólico de própolis vermelha proveniente de Alagoas e concluíram que esse produto apícola exibe elevada atividade antioxidante além de ter demonstrado alto potencial citotóxico sobre as linhas de células de tumores humanos SF- 295, HCT - 116 e OVCAR – 8.

Segundo Kamiya et al. (2012), os principais flavonoides presentes na própolis que possuem ação antioxidante são: quercetina, daidzeína, genisteína e apigenina. Franchi Junior et al. (2012) identificaram a quercetina e a daidzeína na própolis vermelha brasileira e atribuíram a estes compostos a capacidade antioxidante. Mendonça et al. (2015b) analisando extratos etanólicos de própolis e suas frações (hexano, clorofórmio e acetato de etila) quanto ao potencial antioxidante, concluíram que as frações de clorofórmio e hexano possuem maior atividade. Este resultado corrobora com os relatados por Cabral et al. (2009) sobre a avaliação da atividade antioxidante de própolis vermelha brasileira.

Diversos pesquisadores relatam a capacidade antioxidante da própolis proveniente de diferentes origens, como: Argentina (LIMA et al., 2009), Brasil (NAGAI et al., 2003; CABRAL et al., 2009; MAIA-ARAUJO et al., 2015); China (AHN et al., 2007); Colômbia (PALOMINO et al., 2009); Grécia e Chipre (KALOGEROPOULOS et al., 2009); Irã (MOHAMMADZADEH et al., 2007); Japão (KUMAZAWA et al., 2007); Coreia (AHN et al., 2004); Taiwan (CHEN et al., 2008), Turquia (GECKIL et al., 2005) e Portugal (MOREIRA et al., 2008; MIGUEL et al., 2010).

Estudos demonstram potencial antioxidante de alguns flavonoides identificados em amostras de própolis vermelha e *D. ecastaphyllum*, como: isoliquiritigenina (ONDRIAS et al., 1997) e pinobanksina (BLANCO-AYALA et al., 2013). De acordo com vários estudos, existe correlação entre os compostos fenólicos e flavonoides e as variadas atividades

biológicas da própolis, ou seja, além da atividade antioxidante diversos autores associam estes marcadores a atividade antimicrobiana (CHOI et al., 2006; CASTRO et al., 2007; ALENCAR et al., 2007; CABRAL et al., 2009; RIGHI et al., 2011; OLDONI et al., 2011; LÓPEZ & SAWAYA, 2012).

Mendonça et al. (2015a), analisando a própolis vermelha sergipana, encontraram os maiores níveis de fenóis totais já descrito e observaram que a sazonalidade não influenciou a atividade antifúngica deste produto. Este trabalho corroborou com os de Choi et al. (2006) e Castro et al. (2007) que avaliando diferentes tipos de própolis os melhores resultados de atividade antimicrobiana estavam associados a maiores concentrações de flavonoides nas amostras. Outros trabalhos também demonstraram a atividade antifúngica da própolis em diferentes espécies de *Candida* (SFORCIN et al., 2001; UZEL et al., 2005).

Nedji & Loucif-Ayad (2014) demonstraram a atividade antimicrobiana de amostras de própolis frente a *Bacilos cereus* e *S. Aureus*. De acordo com Waldner-Tomic et al. (2014) a própolis possui atividade frente a *S. Mutans*, *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *C. albicans* porém, quando comparada a substancias de controle positivo é menos eficaz a depender da espécie bacteriana sendo necessário concentrações mais elevadas do extrato. Vasconcelos et al. (2014) afirmam que a própolis vermelha tem potencial antimicrobiano mais ativo do que a verde e sugeriram que o produto apícola pode ser uma alternativa terapêutica contra agentes infecciosos da cavidade oral. Bispo Junior et al. (2012) analisaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e frações de própolis vermelha obtida no estado de Alagoas frente a bactérias gram positiva, gram negativa e fungos do gênero *Candida* sp e observaram que as frações apresentaram maior efetividade frente a microrganismos gram positivos e *Candida albicans*.

Diversos trabalhos com a própolis vermelha sergipana tem demonstrado potencial antimicrobiano. Mendonça et al. (2011), ao analisar a composição da fração solúvel em éter etílico do extrato, comprovaram atividade frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Utilizando amostra da mesma região, foi concluído que o extrato hidroalcóolico da própolis possui efetividade frente a *Candida albicans* (BITTENCOURT et al., 2014) e *Enterococcus faecalis* (SIQUEIRA et al., 2014). Araújo (2014) avaliou o efeito dos extratos hidroalcóolicos não só da própolis vermelha, mais também da *D. ecastaphyllum*, em promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonenses* e demonstrou que ambos os extratos apresentaram atividade leishmanicida, porém, o efeito foi mais acentuado na espécie *L. amazonensis*.

Na medicina popular, muitas espécies de *Dalbergia* são utilizadas como antimicrobianos (VASUDEVA et al., 2009). Alguns trabalhos associam a atividade antimicrobiana de espécies deste gênero a presença de flavonoides (DEESAMER et al., 2007; NARAYANAN et al., 2007). Esta afirmação corrobora o trabalho realizado por Aresi (2011) que observou uma correlação entre o conteúdo de fenólicos totais e a atividade antibacteriana, pois os compostos fenólicos bioativos ficaram concentrados na fração acetato de etila, justificando a forte atividade detectada frente a *S. aureus*.

Aresi (2011) avaliou através do método de difusão em disco o extrato etanólico das folhas e da casca da semente da *D. ecastaphyllum* e suas frações frente a *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* e demonstrou que estes apresentaram atividade antimicrobiana somente frente a bactérias gram positivas. Guedes et al. (2014) sugerem que o extrato etanólico e a fração hexânica de *D. ecastaphyllum* podem ser usados como uma fonte de produtos naturais com vista a alterar a resistência das bactérias *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* aos antibióticos.

Impulsionado pela necessidade de identificar os componentes responsáveis pela atividade biológica dos produtos naturais, os métodos analíticos aplicados em análises de própolis tem evoluído na tentativa de garantir a qualidade dos produtos elaborados (SAWAYA et al., 2011). No desenvolvimento da medicina fitoterápica é indispensável garantir a eficácia, segurança e reprodutibilidade da atividade farmacológica. Segundo Peters et al. (2015), estes requisitos só são alcançados com a padronização do processo produtivo e dos componentes químicos.

10. Padronização de extratos vegetais

Para um extrato ser considerado padronizado, os marcadores químicos identificados na origem botânica devem estar presentes no produto final onde a potência e quantidade dos compostos devem ser assegurados na preparação. Isso confirma que o composto bioativo estará presente com a mesma eficácia de lote para lote (RASHEED et al., 2012). Segundo Garg et al. (2012), a padronização de medicamentos derivados de espécies vegetais envolve a coleta de informações e o emprego de rigorosas medidas de controle de qualidade desde o cultivo da planta medicinal até o produto terapêutico finalizado.

Estudos afirmam que diversos aspectos devem ser abordados para certificar os extratos padronizados à base de plantas. Dentre eles estão: identificação do composto bioativo, teor de água, ensaio químico do marcador, impurezas inorgânicas (metais tóxicos), limites microbianos, micotoxinas, pesticidas e outros (ONG, 2004; GARG et al., 2012). Outrossim,

existem muitas dificuldades técnicas na produção de marcadores químicos, como por exemplo: temperatura, luz e solventes que podem causar degradação e/ou transformação dos compostos purificados; além da presença de isômeros (RASHEED et al., 2012).

Compostos de espécies vegetais considerados marcadores farmacologicamente ativos são altamente úteis para a padronização e autenticidade de extratos. Eles são constituintes químicos de uma matéria prima, responsável pela atividade biológica, utilizado para fins de identificação e/ou controle de qualidade, especialmente quando os componentes ativos não são conhecidos ou caracterizados. Esta padronização envolve a caracterização química por espectroscopia ou a impressão digital cromatográfica (ONG, 2004; LIANG et al., 2004; RASHEED et al., 2012; GARG et al., 2012).

O método escolhido para a obter a impressão digital química deve ser capaz de efetuar análise da composição e monitorar se existe variabilidade entre os lotes do extrato padronizado (ONG, 2004). Ao identificar e isolar o composto de uma espécie, responsável por uma determinada atividade biológica, talvez este marcador isolado não possua a mesma atividade, ou seja, os componentes químicos podem desenvolver um efeito sinérgico que se analisados individualmente não apresentam mais a atividade biológica. Pois, normalmente vários compostos são responsáveis pelos efeitos terapêuticos dos extratos à partir de espécies vegetais (LIANG et al., 2004; GARG et al., 2012).

Segundo Fernandes et al. (2009), para assegurar o controle de qualidade e a ação farmacológica, os extratos devem ser padronizados em um certo teor de princípios ativos, ou seja, eles devem ser produzidos de forma a garantir uma concentração definida das substancias específicas, ou grupos de compostos, com eficácia terapêutica conhecida. Porém, as propriedades dos extratos padronizados à partir de espécies vegetais podem ser afetadas por diversos fatores, tais como: variação sazonal, época de colheita, locais de cultivo, processamento pós-colheita, adulterantes ou substitutos de matérias-primas, e procedimentos de extração e preparação. Devido a isso, a matéria-prima deve ser também padronizada para garantir uniformidade na qualidade (LI et al., 2008; RASHEED et al., 2012).

Dependendo do conhecimento disponível em relação aos constituintes ativos da planta, se aceitam dois critérios para a padronização dos extratos e preparações fitoterápicas, são eles: a concentração de substância(s) ativa(s) ou a concentração de marcadores químicos (DAVID et al., 2004). De acordo com Li et al. (2008) e Rasheed et al. (2012) os marcadores desempenham um papel crucial no controle de qualidade dos medicamentos fitoterápicos sendo seu estudo aplicável a muitas áreas de investigação, incluindo autenticação de espécies

originais, procura de novos recursos ou substitutos de matérias-primas, otimização de métodos de extração e purificação, elucidação da estrutura e determinação da pureza.

Diante do exposto, se faz necessário determinar a maioria dos compostos fitoquímicos presente em produtos de origem vegetal, a fim de garantir a confiabilidade e repetibilidade, entendendo a bioatividade dos extratos e os possíveis efeitos colaterais dos compostos ativos, na tentativa de aperfeiçoar o controle de qualidade do produto final.

11. Referências

- ABEROUMAND, A.; DEOKULE, S. S. Comparison of phenolic compounds of some edible plants of Iran and India. **Pak. J. Nutr.**, v.7, n.4, p.582-585, 2008.
- AGUIAR, F.F.A.; TAVARES, A. R.; KANASHIRO, S.; LUZ, P. B.; SANTOS JÚNIOR, N. A. Germinação de sementes de *Dalbergia nigra* (Vell.) Allemão ex Benth. (Fabaceae-Papilionoideae) no armazenamento. **Ciênc. Agrotec.**, v. 34, Edição Especial, p. 1624-1629, 2010.
- AHLUWALIA, V.K.; SESHADRI, T.R. Dalberginone from heartwood of *Dalbergia sisso* **Current Sci.**, v.32, n.10, p.455, 1963.
- AHN, M. R.; KUMAZAWA, S.; USUI, Y.; NAKAMURA, J.; MATSUKA, M.; ZHU, F.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. **Food Chem.**, v.101, p.1400-1409, 2007.
- AHN, M.R.; KUMAZAWA, S.; HAMASAKA, T.; BANG, K.S.; NAKAYAMA, T. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.7286-7292, 2004.
- ALAM, M. A.; JURAIMI, A. S.; RAFII, M. Y.; HAMID, A. A.; AROLU, I. W.; LATIF, M. A. Genetic diversity analysis among collected purslane (*Portulaca oleracea* L.) accessions using ISSR markers. **C. R. Biol.**, v.338, n.1, p.1-11, 2015.
- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: red propolis. **J. Ethnopharmacol.**, v.113, n.2, p.278-283, 2007.
- ALMEIDA, E.C.; MENEZES, H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. **J. Venom. Anim. Toxins.**, v.8, n.2, p.191-212, 2002.
- ANDRADE, A. L. P.; MIOTTO, S. T. S.; SANTOS, É. P. A subfamília Faboideae (Fabaceae Lindl.) no Parque Estadual do Guartelá, Paraná, Brasil. **Hoehnea**, v.36, n.4, p.737-768, 2009.
- ANSARI, M.A.; RAZDAN, R.K.; TANDON, M.; VASUDEVA, P. Larvicidal and repellent actions of *Dalbergis sisso* Roxb. (Family: Leguminasae) oil against mosquitoes. **Bioresource Tech.**, v.73, n.3, p.207211, 2000.
- ARAÚJO, J.M.E. Caracterização química e atividade leishmanicida dos extratos hidroetanólicos de própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* (FABACEAE). 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.
- ARESI, C. Avaliação da potencial atividade antimicrobiana de produtos de origem natural: estudo bioguiado de *Dalbergia ecastophyllum* L. Taub. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, 2011.

- ATANASOV, A. G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E. M.; LINDER, T.; WAWROSCH, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H.; ROLLINGER, J.M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M.D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: a review. **Biotechnol. Adv.**, v.33, p.1582-1614, 2015.
- AWALE, S.; LI, F.; ONOZUKA, H.; ESUMI, H.; TEZUKA, Y.; KADOTA, S. Constituents of brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. **Bioorg. Med. C.**, v.16, n.1, p.181–189, 2008.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem.**, v.99, n.1, p.191-203, 2006.
- BANERJEE, A.; MURTI, V.V.S.; SESHADRI, T.R.; THAKUR, R.S. Chemical components of flowers of *Dalbergia sissoo*. Isolation of 7methyl tectorigenin, a new isoflavone. **Ind J Chem.**, v.1, p.2527, 1963.
- BANERJEE, A.; MURTI, V.V.S.; SESHADRI, T.R. Isolation of sissonin, a new isoflavone glycoside from leaves of *D. sissoo*. **Ind J Chem.**, v.4, n.2, p.7072, 1966.
- BANKOVA, V.; CHRISTOV, R.; POPOV, S.; PUREB, O.; BOCARI, G. Volatile constituents of propolis. **Z. Naturforsch.**, v.49c, p.6-10, 1994.
- BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.D.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3-15, 2000.
- BARROS, L.; DUEÑAS, M.; PINELA, J.; CARVALHO, A. M.; BUELGA, C. S.; FERREIRA, I. C. F. R. Characterization and quantification of phenolic compounds in four tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) farmers' varieties in northeastern Portugal homegardens. **Plant Foods for Human**, v.67, n.3, p.229-234, 2012.
- BCC RESEARCH. Botanical and plant-derived drugs: global markets. 2015. Disponível em: <http://www.bccresearch.com/market-research/biotechnology/botanical-plant-derived-drugs-report-bio022g.html>. Acesso em: 07 de março de 2016.
- BECHO, J.R.M.; MACHADO, H.; GUERRA, M.O. Rutina – estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**. v.1, n.1, p.21– 25, 2009.
- BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: the FRAP assay. **Anal. Biochem.**, v.239, p.70-76, 1996.
- BHAGWAT, R. M.; DHOLAKIA, B. B.; KADOO, N. Y.; BALASUNDARAN, M.; GUPTA, V. S. Two new potential barcodes to discriminate *Dalbergia* species. **Plos One**, v.16, 2015.
- BISPO JUNIOR, W.; MIRANDA, E. O.; ALVINO, V.; ARAUJO, B.; SILVA, D.W.; PORFIRIO, Z. Antimicrobial activity of fractions of red propolis from Alagoas, Brazil. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**. v.33, n.1, p.3–10, 2012.
- BITTENCOURT, F. O.; PADILHA, F. F.; SIQUEIRA, A. L.; DANTAS, C. G. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semi- sólidas contendo extrato hidroalcoólico de propolis vermelha. **Scientia Plena**, v.10, p.104501, 2014.
- BLANCO-AYALA, T.; LUGO-HUITRÓN, R.; SERRANO-LÓPEZ, E.M.; REYES-CHILPA, R.; RANGEL-LÓPEZ, E.; PINEDA, B.; MEDINA-CAMPOS, O. N.; SÁNCHEZ-

- CHAPUL, L.; PINZÓN, E.; TREJO-SOLIS, C.; SILVA-ADAYA, D.; PEDRAZA-CHAVERRÍ, J.; RÍOS, C.; CRUZ, V. P.; TORRES-RAMOS, M. Antioxidant properties of xanthones from *Calophyllum brasiliense*: prevention of oxidative damage induced by FeSO. **BMC Complement Altern. Med.**, v.13, p.262, 2013.
- BOHRER, C. B. A.; DANTAS, H.G. R.; GRONEMBERGER, F.M.; VINCENS, R.S.; ANDRADE, S. F. Mapeamento da vegetação e do uso do solo no centro de diversidade vegetal de Cabo Frio, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodrigésia**, v.60, n.1, p.1-23, 2009.
- BRIJESH, S.; DASWANI, P.G.; TETALI, P.; ANTIA, N.H.; BIRDI, T.J. Studies on *Dalbergia sissoo* (Roxb.) leaves: possible mechanism(s) of action in infectious diarrhea. **Indian J. Pharmacol.**, v.38, p.120-124, 2006.
- BRUNING, M.C.R.; MOSEGUI, G.B.G.; VIANNA, C.M.M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v.17, n.10, p.2675-2685, 2012.
- CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**, v.32, n.6, p.1523-1527, 2009.
- CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food Chem. Toxicol.**, v.51, n.1, p.15–25, 2013.
- CARVALHO, A.M. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. **Brittonia**, v.49, n.1, p.87-100, 1997.
- CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.18, n.2, p.314-319, 2008.
- CARVALHO, M.C.C.G.; SILVA, D.C.G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Ciência Rural**, v.40, n.3, p.735-744, 2010.
- CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. **Quím. Nova**, v.30, n.7, p.1512-1516, 2007.
- CHAWLA, H.; CHIBBER, S.S.; SESHADRI, T.R. Volubilin, a new isoflavone-C-glycoside from *Dalbergia volubilis* flowers. **Phytochemistry**, v.13, p.2301-2304, 1974.
- CHEN, Y.W.; WU, S.W.; HO, K.K.; LIN, S.B.; HUANG, C.Y.; CHEN, C.N. Characterisation of taiwanese propolis collected from different locations and seasons. **J. Sci. Food Agri.** v.88, p.412-419, 2008.
- CHEN, S.L.; YAO, H.; HAN, J.P.; LIU, C.; SONG, J.Y.; SHI, L.C.; ZHU, Y.; MA, X.; GAO, T.; PANG, X.; LUO, K.; LI, Y.; LI, X.; JIA, X.; LIN, Y.; LEON, C. Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. **Plos One**, v.5, n.1, 2010.
- CHOI, Y.M.; NOH, D.O.; CHO, S.Y.; SUH, H.J.; KIM, K.M.; KIM, J.M. Antioxidant and antimicrobial activities of propolis from several regions of Korea. **Food Sci. Technol. Res.**, v.39, n.7, p.756-761, 2006.

CNIP - Centro Nordestino de Informações sobre Plantas. Disponível em: http://www.cnip.org.br/bdnp/busca_geral.php?pagina=1&init=0&tipo=gen&id=358&desc=Dalbergia. Acesso em: 01 mar 2016.

COHEN, S.D.; KENNEDY, J.A. Plant metabolism and the environment: implications for managing phenolics. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, v.50, p.620–643, 2010.

COSTA, A.S.; MACHADO, B.A.S.; UMSZA-GUEZ, M.A.; CIRQUEIRA, M.G.; NUNES, S.B.; PADILHA, F.F. Levantamento dos estudos com a própolis produzida no estado da Bahia. **Sitientibus série Ciências Biológicas**, v.13, p.10.13102, 2014.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S.S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v.1, n.3, 2009.

DALARMI, L.; SILVA, C.B.; CAMPOS, F.M.M.O.; BURCI, L.M.; NASCIMENTO, K.F.; JESUS, C. DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G.; ZANIN, S.M.W. Larvicidal activity of *Dalbergia brasiliensis* (Fabaceae - Papilionoideae) on *Aedes aegypti*. **Afr. J. Pharm. Pharmacol.**, v.9, n.35, p.881-885, 2015.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.**, v.5, n.4, p.435–441, 2008.

DAVID, J. P. L.; NASCIMENTO, J.A.P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma**, v.16, p. 9-10, 2004.

DE PAEPE, D.; SERVAES, K.; NOTEN, B.; DIELS, L.; DE LOOSE, M.; VAN DROOGENBROECK, B.; VOORSPOELS, S. An improved mass spectrometric method for identification and quantification of phenolic compounds in apple fruits. **Food Chem.**, v.136, n.2, p.368–375, 2013.

DEESAMER, S.; KOKPOL, U.; CHAVASIRI, W.; DOUILLARD, S.; PEYROT, V.; VIDAL, N.; COMBES, S.; FINET, J.P. Synthesis and biological evaluation of isoflavone analogues from *Dalbergia oliveri*. **Tetrahedron**, v.63, p.12986-12993, 2007.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2 ed. Sao Paulo: UNESP, 2002.

DIAS, M.I.; SOUSA, M.J.; ALVES, R.C.; FERREIRA, I. C.F.R. Exploring plant tissue culture to improve the production of phenolic compounds: a review. **Ind. Crops Prod.**, v.82, p.9–22, 2016.

DONNELLY, D.M.X.; KEENAN, P.J.; PRENDERGAST, J.P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v.12, p.1157-1161, 1973.

ECHEVERRIGARAY, S.; AGOSTINI, G.; ATTI-SERFINI, L.; PAROUL, N.; PAULETTI, G.F.; ATTI DOS SANTOS, A.C. Correlation between the chemical and genetic relationships among commercial thyme cultivars. **J.Agric. Food Chem.**, v.49, p.4220-4223, 2001.

ECHEVERRIGARAY, S.; FRACARO, F.; ATTI DOS SANTOS, A.C.; PAROUL, N.; WASUM, R.; ATTI-SERAFINI, L. Essential oil composition of south brazilian populations of *C. galioides* Benth and its relation with the geographic distribution. **Biochem. Syst. Ecol.**, v.31, p.467-475, 2003.

FANTACCIONE, S.; WOODROW, P.; PONTECORVO, G. Molecular authentication of three italian melon accessions by ARMS-PCR and ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) secondary structure prediction. **Bioinformation**, v.2, n.7, p.311-315, 2008.

- FERNANDES, J.M.; GARCIA, F.C.P. Leguminosae em dois fragmentos de floresta estacional semidecidual em araponga, Minas Gerais, Brasil: arbustos, subarbustos e trepadeiras. **Rodriguésia**, v.59, n.3, p.525-546, 2008.
- FERNANDES, R. S.; LOURENÇO, M.V.; MIRANDA, C.E.S.; FRANÇA, S.C.; JANUÁRIO, A.H. Validação do método de extração e quantificação de 7-hidróxi- 4',6-dimetóxi-isoflavona em culturas de células em suspensão e calos de *Dipteryx odorata*. **Eclet. Quím.**, v.34, n.1, 2009.
- FERNANDES, J. M.; GARCIA, F. C. P.; SIQUEIRA, L.C.; MAROTTA, C.P.B. Leguminosae em fragmentos de floresta estacional semidecidual, Araponga, MG: árvores e lianas. **Hoeheia**, v.38, n.1, p.9-29, 2011.
- FERREIRA, M. E.; GRATTAPAGLIA, D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3. ed. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN, 220 p, 1998.
- FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G. Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais. Curso Teórico-Prático, Edição Centro de Biotecnologia Vegetal – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, Lisboa, Portugal (3ª Edição ISBN: 978-972-9348-16-7). 2007.
- FRANCHI JR., G.C.; MORAES, C.S.; TORETI, V.C.; A.DAUGSCH; NOWILL, A.E.; PARK, Y.K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT Assay. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.**, p.1-6, 2012.
- FRANCIS, J.K. Wildland Shrubs of the United States and its territories: Thamnic descriptions. U.S. Dept. of Agriculture, Forest Service, International Institute of Tropical Forestry, 2004. Disponível em: http://www.fs.fed.us/rm/pubs_other/iitf_gtr026.pdf. Acesso em: jan. 2016.
- GANOPOULOS, I.; KALIVAS, A.; KAVROULAKIS, N.; XANTHOPOULOU, A.; MASTROGIANNI, A.; KOUBOURIS, G.; MADESIS, P. Genetic diversity of Barbary fig (*Opuntia ficus-indica*) collection in Greece with ISSR molecular markers. **Plant Gene**. v.2, p.29–33, 2015.
- GAO, T.; YAO, H.; SONG, J.Y.; LIU, C.; ZHU, Y.J.; MA, X.Y.; PANG, X.; XU, H.; CHEN, S. Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. **J. Ethnopharmacol.**, v.130, n.1, p.116–21, 2010.
- GARG, V.; DHAR, V.J.; SHARMA, A.; DUTT, R. Facts about standardization of herbal medicine: a review. **Chin. J. Integr. Med.**, v.10, n.10, 2012.
- GECKIL, H.; ATES, B.; DURMAZ, G.; ERDOGAN, S.; YILMAZ, I. Antioxidant, free radical scavenging and metal chelating characteristics of propolis. **Am. J. Biochem. Biotechnol.**, v.1, p.27-31, 2005.
- GREGSON, M.; OLLIS, W.D.; SUTHERLAND, I.O.; GOTTLIEB, O.R.; MAGALHAES, T. Violstyrene and iso violstyrene, cinnamylphenols from *Dalbergia Miscolobium*. **Phytochemistry**, v.17, p.1375-1377, 1978.
- GUAADAOU, A.; BENAICHA, S.; ELMAJDOUB, N.; BELLAOU, M.; HAMAL, A. What is a bioactive compound? A combined definition for a preliminary consensus. **Int. J. Food Sci. Nutr.**, v.3, n.3, p.174–179, 2014.
- GUEDES, G. M. M.; ALBUQUERQUE, R. S.; SOARES-MACIEL, R. S.; FREITAS, M.A.; SILVA, V.A.; LIMA, E.O.; LIMA, M.A.; CUNHA, E.V.L.; COUTINHO, H.D.M. Isolation

- of phytosterols of *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub. (Leguminosae) and modulation of antibiotic resistance by a possible membrane effect. **Arabian J. Chem.**, p.10-14, 2014.
- GURNANI, N.; MEHTA, D.; GUPTA, M.; MEHTA, B. K. Natural Products: source of potential drugs. **J. Basic Appl. Sci.**, v.6, n.6, p.171–186, 2014.
- HAJARE, S.W.; CHANDRA, S.; SHARMA, J.; TONDON, S.K.; LAL, J.; TELANJ, A.J. AntiInflammatory activity of *Dalbergia sisso* leaves. **Fitoterapia**. v.72, p.131-139, 2001.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radic. Biol. Med.**, v.18, p.125–126, 1995.
- HALLIWELL, B., Biochemistry of oxidative stress. **Biochem. Soc. Trans.**, v.35, p.1147–1150, 2007.
- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since1992, **Phytochemistry**, v.55, p.481–504, 2000.
- HAUSEN, B.M. Rosewood allergy due to an arm bracelet and a recorder. **Occupation and Environment**. v.30, p.189-192, 1982.
- HEATHER, J.M.; CHAIN, B. The sequence of sequencers: the history of sequencing DNA. **Genomics**, v.107, p.1–8, 2016.
- HOU, J.P.; WU, H.; HO, C.T.; WENG, X.C. Antioxidant activity of polyphenolic compounds from *Dalbergia odorifera* T. Chen. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.10, p.694-701, 2011.
- HYE, H.K.M.A.; GAFUR, M.A. Anti inflammatory and antiarthritic activity of a substance isolated from *Dalbergia volubilis*. **Indian J. Med. Res.**, v.63, n.1, p.93-100, 1975.
- JAIN, S.; MARCHIORO, G.; MENDONÇA, L.; BATISTA, M.; ARAUJO, E. Botanical origin of the brazilian red propolis: a new approach using DNA analysis. **J. Apicult. Sci.**, v.58, n.2, p.79–85, 2014.
- KALOGEROPOULOS, N.; KONTELES, S. J.; TROULLIDOU, E.; MOURTZINOS, I.; KARATHANOS, V. T. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chem.**, v.116, n.2, p.452-461, 2009.
- KAMIYA, T.; NISHIHARA, H.; HARA, H.; ADACHI, T. Ethanol extract of brazilian red propolis induces apoptosis in human breast cancer MCF-7 cells through endoplasmic reticulum stress. **J. Agric. Food Chem.**, v.60, p.11065–70, 2012.
- KAZEMBE, T.; MUNYARARI, E.; CHARUMBIRA, I. Use of traditional herbal medicines to cure malaria. **B.E.P.L.S.**, v.1, p.63-85, 2012.
- KHAN, I.A.; AVERY, M.A.; BURANDT, C.L.; GOINS, D.K.; MIKELL, J.R.; NASH, T.E.; AZADEGAN, A.; WALKER, L.A. Antigiardial activity of isoflavones from *Dalbergia frutescens* bark. **J. Nat. Prod.**, v.63, n.10, p.1414-1416, 2000.
- KHLEBNIKOV, A.I.; SCHEPETKIN, I.A.; DOMINA, N.G.; KIRPOTINA, L.N.; QUINN, M.T. Improved quantitative structure–activity relationship models to predict antioxidant activity of flavonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. **Bioorg. Med. Chem.**, v.15, p.1749–1770, 2007.
- KIM, J. H.; SIM, H.; LEE, R.; HONG, J. UHPLC separation of structurally diverse markers in Fangchi species. **Bull. Korean Chem. Soc.**, v.34, n.3, p.975–978, 2013.

- KITE, G.C.; GREEN, P.W.C.; VEITCH, N.C.; GROVES, M.C.; GASSON, P.E.; SIMMONDS, M.S.J. Dalnigrin, a neoflavonoid marker for the identification of brazilian rosewood (*Dalbergia nigra*) in CITES enforcement. **Phytochemistry**, v.71, p.1122-1131, 2010.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 30, n. 3, p. 241–248, 2009.
- KRAUSE, J.; TOBIN, G. Discovery, development and regulation of natural products, in using old solutions to new problems – natural drug discovery in the 21st Century. Ed., Kulka, M., InTech Publishers. p.3-35, 2013.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. **Am J Med.**, v.113, n.9B, p.71S-88S, 2002.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food Bioprod Process.**, v.89, n.3, p.217–233, 2011.
- KUMAZAWA, S.; GOTO, H.; HAMASAKA, T.; FUKUMOTO, S.; FUJIMOTO, T.; NAKAYAMA, T. A new prenylated flavonoid from própolis collected in Okinawa, Japan. **Biosci Biotechnol Biochem.**, v.68, n.1, p.260-262, 2004.
- KUMAZAWA, S.; UEDA, R.; HAMASAKA, T.; FUKUMOTO, S.; FUJIMOTO, T.; NAKAYAMA, T. Antioxidant prenylated flavonoids from propolis collected in Okinawa, Japan. **J. Agr. Food Chem.**, v.55, p.7722-7725, 2007.
- KUPIEC, T. Quality-control analytical methods: high-performance liquid chromatography. **Int. J. Pharm. Compd.**, v.8, n.3, p.223–227, 2004.
- LAVIN, M.; SCHRIRE, B.; LEWIS, G.; PENNINGTON, R. T.; DELGADO-SALINAS, A.; THULIN, M.; HUGHES, C.; BEYRA MATOS, A.; WOJCIECHOWSKI, M.F. Metacommunity process rather than continental tectonic history better explains geographically structured phylogenies in legumes. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v.359, p.1509-1522, 2004.
- LEE, S.H.; KIM, J.Y.; SEO, G.S.; KIM, Y.C.; SOHN, D.H. Isoliquiritigenin from *Dalbergia odorifera*, up regulates anti-inflammatory heme oxygenase-1 expression in RAW 264.7 macrophages. **Inflamm. Res.** v.58, n.5, p.257-262, 2009.
- LEWIS, G.P. Legumes of Bahia. **Kew, Royal Botanic Gardens**, 1987.
- LEWIS, G. P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. Legumes of the world. **Royal Botanic Gardens, Kew**, p.592, 2005.
- LI, S.; HAN, Q.; QIAO, C.; SONG, J.; CHENG, C.L.; XU, H. Chemical markers for the quality control of herbal medicines: an overview. **Chin Med.**, v.3, n.7, 2008.
- LI, D.Z.; GAO, L.M.; LI, H.T.; WANG, H.; GE, X.J.; LIU, J.Q.; CHEN, Z. D.; ZHOU, S. L.; CHEN, S. L.; YANG, J. B.; FU, C. X.; ZENG, C. X.; YAN, H. F.; ZHU, Y. L.; SUN, Y. S.; CHEN, S. Y.; ZHAO, L.; WANG, K.; YANG, T.; DUAN, G. W. Comparative analysis of a large dataset indicates that internal transcribed spacer (ITS) should be incorporated into the core barcode for seed plants. **P. Natl. Acad. Sci.**, v.108, n.49, p.19641–6, 2011.
- LIANG, Y.Z.; XIE, P.; CHAN, K. Quality control of herbal medicines. **J. Chromatogr. B**, v.812, p.53–70, 2004.

LIMA, B.; TAPIA, A.; LUNA, L.; FABANI, M. P.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; PODIO, N. S.; WUNDERLIN, D. A.; FERESIN, G. E. Main flavonoids, DPPH activity, and metal content allow determination of the geographical origin of propolis from the province of San Juan (Argentina). **J. Agric. Food Chem.**, v.57, p.2691-2698, 2009.

LIMA, H.C.; QUEIROZ, L.P.; MORIM, M.P.; SOUZA, V.C.; DUTRA, V.F.; BORTOLUZZI, R.L.C.; IGANCI, J.R.V.; FORTUNATO, R.H.; VAZ, A.M.S.F.; SOUZA, E.R. DE; FILARDI, F.L.R.; GARCIA, F.C.P.; FERNANDES, J.M.; MARTINS-DA-SILVA, R.C.V.; PEREZ, A.P.F.; MANSANO, V.F.; MIOTTO, S.T.S.; TOZZI, A.M.G.A.; MEIRELES, J.E.; LIMA, L.C.P.; OLIVEIRA, M.L.A.A.; FLORES, A.S.; TORKE, B.M.; PINTO, R.B.; LEWIS, G.P.; BARROS, M.J.F.; SCHÜTZ, R.; PENNINGTON, T.; KLITGAARD, B.B.; RANDO, J.G.; SCALON, V.R.; CARDOSO, D.B.O.S.; COSTA, L.C. DA; SILVA, M.J. DA; MOURA, T.M.; BARROS, L.A.V. DE; SILVA, M.C.R.; QUEIROZ, R.T.; SARTORI, A.L.B.; CAMARGO, R. A.; LIMA, I.B.; COSTA, J.; VALLS, J.F.M. Fabaceae. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/vol2.pdf>>. Acesso em 15 abril 2016.

LIMA, H.C. *Dalbergia* in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. (<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB083014>). 2012.

LÓPEZ, B. G. C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chem.** v.146, p.174–180, 2014.

LÓPEZ, B.G.C.; SAWAYA, A.C.H.F. A review of the plant origins, composition and biological activity of red propolis. In R. E. Goncalves & M. Cunha Pinto (Eds.), Natural products: Structure, bioactivity and applications. **Nova Science Publishers**. p.83–96, 2012.

LOTTI, C.; FERNANDEZ, M. C.; PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; HERNANDEZ, I. M.; RASTRELLI, L. Chemical constituents of red mexican propolis. **J. Agric. Food Chem.**, v.58, p.2209-2213, 2010.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L.C.C.; RANDAU, K.P.; ROLIM NETO, P.J. Propolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. bras. farmacogn.**, v.18(3), 2008.

MAIA-ARAÚJO, Y.L.F.; MENDONÇA, L.S.; GUALBERTO, N.C.; ORELLANA, S.C.; CARDOSO, J.C.; JAIN, S.; ARAÚJO, E.D.; NARAIN, N. Antioxidant activity and phenolic content of the red propolis from the state of Sergipe, Brazil. **Rev. Biol. Ciênc. Terra**, v.16, p.1-5, 2015.

MALDANER, L.; JARDIM, I. C. S. F. UHPLC- Uma abordagem atual: desenvolvimento e desafios recentes. **Scientia Chromatographica**, v.4, n.3, p.197–207, 2012.

MARCELINO, F.C.; BINNECK, E.; ABDELNOOR, R.V.; NEPOMUCENO, A.L. Ferramentas biotecnológicas aplicadas à cultura da soja. **Circular Técnica da Embrapa**. ISSN: 1516-7860. 2007.

MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V.S. Chemical composition, plant origin and biological activity of brazilian propolis. **Curr. Topics Phytochemistry**, v.2, p.115-123, 1999.

MARTI, R.; VALCARCEL, M.; HERRERO-MARTINEZ, J.M.; CEBOLLA-CORNEJO, J.; ROSELLO, S. Fast simultaneous determination of prominent polyphenols in vegetables and fruits by reversed phase liquid chromatography using a fused-core column. **Food Chem.** v.169, p.169–179, 2015.

- MARTÍNEZ-HUÉLAMO, M.; TULIPANI, S.; JÁUREGUI, O.; VALDERAS-MARTINEZ, P.; VALLVERDÚ-QUERALT, A.; ESTRUCH, R.; TORRADO, X.; LAMUELA-RAVENTÓS R. M. Sensitive and rapid UHPLC-MS/MS for the analysis of tomato phenolics in human biological samples. **Molecules**, v.20, p.20409–25, 2015.
- MARTINS, F.A.C.B. Estudo comparativo entre a PNPIC e a PNPMF e seus reflexos no estado do Rio de Janeiro. Monografia. Instituto de tecnologia de fármacos – **FIOCRUZ**. 2013
- MATA, V. P. Ocorrência natural e aspectos de interesse agrônomo de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taubert (Fabaceae) no estado da Bahia: base para a produção da própolis vermelha. 2014. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2014.
- MATA, V.P.; COSTA, M.A.P.C.; MORAIS, D.V.; CARVALHO, C.A.L. Germinação de sementes de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taubert sob diferentes temperaturas. **Enciclopédia biosfera**, Centro Científico Conhecer, v.10, n.18, p.1832, 2014.
- MATOS, F.J.D.A.; GOTTLIEB, O.R.; ANDRADE, C.H.S. Flavonoids from *Dalbergia ecastaphyllum*. **Phytochemistry**, v.14, p.825-826, 1975.
- MEDIC-SARIC, M.; JASPRICA, I.; SMOLCIC-BUBALO, A.; MORNAR, A. Optimization of chromatographic conditions in thin layer chromatography of flavonoids and phenolic acids. **Croat. Chem. Acta**, v.77, n.1–2, p.361-366, 2004.
- MENDES, C. E.; CASARIN, F.; OHLAND, A. L.; FLACH, A.; COSTA, M. A.; DENARDIN, R. B. N.; MOURA, N. F. Efeitos das condições ambientais sobre o teor e variabilidade dos óleos voláteis de *Dalbergia frutescens* (vell.) Britton (Fabaceae). **Quim. Nova**, v.35, p.1787-1793, 2012.
- MENDONÇA, L.S.; MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; ORELLANA, S. C.; CARDOSO, J. C.; ARAÚJO, E. D. Influência da coloração de frações cromatográficas na atividade antimicrobiana de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v.7, n.10, 2011.
- MENDONÇA, L.S.; MENDONÇA, F.M.R.; MAIA-ARAÚJO, Y.L.M.; ARAÚJO, E.D.; RAMALHO, S.A.; NARAIN, N.; JAIN, S.; ORELLANA, S.C.; PADILHA, F.F.; CARDOSO, J.C. Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. **Food Sci. Technol**, v.35, n.2, p.291-298, 2015a.
- MENDONÇA, I.C.G.; PORTO, I.C.C.M.; NASCIMENTO, T.G.; SOUZA, N.S.; OLIVEIRA, J.M.S.; ARRUDA, R.E.S.; MOUSINHO, K.C.; SANTOS, A.F.; BASÍLIO-JÚNIOR, I.D.; PAROLIA, A.; BARRETO, F.S. Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. **BMC Compl. Alternative Med.**, v.15, p.357, 2015b.
- MIDDLETON, E.J.R.; KANDASWAM, C.; THEOHARIDES, T. C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacol. Rev.**, v.53, p.673-751, 2000.
- MIGUEL, M.G.; NUNES, S.; DANDLEN, S.A.; CAVACO, A.M.; ANTUNES, M.D. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. **Food Chem. Toxicol.**, v.48, p.3418–3423, 2010.
- MOEIN, M. R.; MOEIN, S.; AHMADIZADEH, S. Radical scavenging and reducing power of *Salvia mirzayanii* subfractions. **Molecules**. v.13, p.2804–2813, 2008.
- MOHAMMADZADEH, S.; SHARIATPANAH, M.; HAMED, M.; AHMADKHANIHA, R.; SAMADI, N.; OSTAD, S.N. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of iranian propolis. **Food Chem.**, v.103, p.1097–1103, 2007.

- MORAES, C. S.; DAUGSCH, A.; LI, H.; RHIM, J. S.; PARK, Y. K. Comparative antiproliferation of human prostate cancer cells by ethanolic extracts of two groups of brazilian propolis. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.30, n.2, p.539–543, 2010.
- MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, J. A.; ESTEVINHO, L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. **Food Chem. Toxicol.**, v.46, n.11, p.3482–3485, 2008.
- MORENO, M.I.N.; ISLA, M.I.; SAMPIETRO, A.R.; VATTUONE, M.A. Comparison of the free radical-scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **J. Ethnopharmacol.**, v.71, n.1–2, p.109–114, 2000.
- MUANGNOICHAROEN, N.; FRAHM, A.W. Neoflavlanoids of *Dalbergia parviflora*, **Phytochemistry.**, v.21, n.3, p.767-772, 1982.
- NAGAI, T.; SAKAI, M.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. **Food Chem.**, v.75, p.237-240, 2001.
- NAGAI, T.; INOUE, R.; INOUE, H.; SUZUKI, N. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chem.**, v.80, p.29-33, 2003.
- NARAYANAN, M.C.; RAO, P.R.; SHANMUGAN, N.N.; GOPALAKRISHNAN, S.M.; DEVI, K. Isolation and characterization of bioactive isoflavonoids from the roots of *Dalbergia horrida*. **Nat. Prod. Res.**, v.21, n.10, p.903-909, 2007.
- NEDJI, N.; LOUCIF-AYAD, W. Antimicrobial activity of algerian propolis in foodborne pathogens and its quantitative chemical composition. **Asian Pac. J. Trop. Dis.**, v.4, n.6, p.433–437, 2014.
- NEUWINGER, H.D. African traditional medicine: a dictionary of plant use and applications. Medpharm Scientific, Stuttgart, Germany, p.589, 2000.
- NUNES, L.C.C.; GALINDO, A.B.; DEUS, A.S.O.; RUFINO, D.A.; RANDAU, K.P.; XAVIER, H.S.; CITÓ, A.M.G.L.; ROLIM NETO, P.J. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Braz. J. Pharmacog.**, v.19, n.2B, p.524-529, 2009.
- O'RAWWE, J.A.; FERSON, S.; LYON, G.J. Accounting for uncertainty in DNA sequencing data. **Trends Genet.**, v.31, n.2, p.61-66, 2015.
- OLDONI, T. L. C.; CABRAL, I. S. R.; D'ARCE, M. A. B. R.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of brazilian propolis. **Sep. Purif. Technol.**, v.77, n.2, p.208–213, 2011.
- ONDRIAS, K.; STASKO, A.; HROMADOVÁ, M.; SUCHY, V.; NAGY, M. Pinobanksin inhibits peroxidation of low density lipoprotein and it has electron donor properties reducing alpha-tocopherol radicals. **DiePharmazie**, v.52, p.566–7, 1997.
- ONG, E.S. Extraction methods and chemical standardization of botanicals and herbal preparations. **J. Chromatogr. B.**, v.812, p.23–33, 2004.
- PALOMINO, R.; GARCIA, C. M.; GIL, J. H.; ROJANO, B. A.; DURANGO, D. L. Determination of phenolic content and evaluation of antioxidant activity of propolis from Antioquia (Colombia). **Vitae**, v.16, p.388-395, 2009.
- PARK, Y.K.; ALENCAR, S.M.; AGUIAR, C.L. Botanical origin and chemical composition of brazilian propolis. **J. Agric. Food Chem.**, v.50, p.2502-2506, 2002.

- PEREZ, A.; GONZALEZ-MANZANO, S.; JIMENEZ, R.; PEREZ-ABUD, R.; HARO, J.M.; OSUNA, A.; SANTOS-BUELGA, C.; DUARTE, J.; PEREZ-VIZCAINO, F. The flavonoid quercetin induces acute vasodilator effects in healthy volunteers: correlation with beta-glucuronidase activity. **Pharmacol. Res.**, v.89, p.11–18, 2014.
- PETERS, C. A.; SGROTT, R. A. G.; PETERS, R. R.; MOTERLE, D.; MADEIRA, F.; EMER, A.A.; PIOVEZAN, A.P.; KANIS, L.A. Production of *Wilbrandia ebracteata* extract standardized in flavonoids and dihydrocurcubitacin and assessment of its topical anti-inflammatory activity. **Ind Crop Prod.**, v.69, p.123–128, 2015.
- PHONG, D.T.; TANG, D.V.; HIEN, V.T.T.; TON, N.D.; VAN, H. N. Nucleotide diversity of a nuclear and four chloroplast DNA regions in rare tropical wood species of *Dalbergia* in Vietnam: a DNA barcode identifying utility. **Asian J Appl Sci.**, v.02, n.02, p.116–25, 2014.
- PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **J. Agr. Food Chem.**, v.59, n.12, p.6484–6491, 2011.
- PINTO, R. M. C.; LEMES, B. M.; ZIELINSKI, A. A. F.; KLEIN, T.; PAULA, F.; KIST, A.; MARQUES, A.S.F.; NOGUEIRA, A.; DEMIATE, I.M.; BELTRAME, F.L. Detection and quantification of phytochemical markers of *Ilex paraguariensis* by liquid chromatography. **Quim. Nova.**, v.38, n.9, p.1219-1225, 2015.
- PURVIS, A.; HECTOR, A. Getting the measure of biodiversity. **Nature**, v.405, p.212–219, 2000.
- QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POYSÉGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angew Chem Ind.**, v.50, p.586-621, 2011.
- QUINMING, Y.; XIANHUI, P.; WEIBAO, K.; HONG, Y.; YIDAN, S.; ZHANG, L. Antioxidant activities of malt extract from barley (*Hordeum vulgare* L.) towards various oxidative stress in-vitro and in-vivo. **Food Chem.**, v.118, p.84–89, 2010.
- RAO, N.K. Plant genetic resources: advancing conservation and use through biotechnology, **Afr. J. Biotechnol.**, v.3, p.136–145, 2004.
- RAO, Y. K.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **J. Ethnopharmacol.**, v.100, n.3, p.249–253, 2005.
- RASHEED, N.M.A.; NAGAIAH, K.; GOUD P.R.; SHARMA V.U.M. Chemical marker compounds and their essential role in quality control of herbal medicines. **Annals of Phytomedicine.**, v.1, n.1, p.1-8, 2012.
- REYS, O.; CANTILLO, F.A. Fitocenosis presentes em las áreas costeras del sur de La Sierra Maestra, Cuba. I. comunidades com influencia marina. **Foresta Veracruzana.**, v.5, n.2, p.1-7, 2003.
- RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **J. Sci. Food Agr.**, v.91, n.13, p.2363–2370, 2011.
- ROMAN, A.L.C.; SANTOS, J.U.M. A importância das plantas medicinais para a comunidade pesqueira de Algodão Bol. Mus. para. Emílio Goeldi. **Ciências Naturais.**, v.1, n.1, p.69-80, 2006.

- ROUT, G. R.; BHATACHARYA, D.; NANDA, R. M.; NAYAK, S.; DAS, P. Evaluation of genetic relationships in *Dalbergia* species using RAPD markers. **Biodivers. Conserv.**, v.12, n.2, p.197–206, 2003.
- ROY, N.; LASKAR, R.A.; SK, I.; KUMARI, D.; GHOSH, T.; BEGUM, N.A. A detailed study on the antioxidant activity of the stem bark of *Dalbergia sissoo* Roxb., an Indian medicinal plant. **Food Chem.**, v.126, p.1115–1121, 2011.
- RUSSO, A.; LONGO, R.; VANELLA, A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester and galangin. **Fitoterapia**, v.73, n.1, p.21–29, 2002.
- SAHA, S.; SHILP, J. A.; MONDAL, H.; HOSSAIN, F.; ANISUZZMAN, M.; HASAN, M. M.; CORDELL, G. A.; Ethnomedicinal, phytochemical, and pharmacological profile of the genus *Dalbergia* L. (Fabaceae). **Phytopharmacology**, v.4, p.291-346, 2013.
- SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M.S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y.S.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Nat. Prod. Rep.**, v.27, p.238-254, 2010.
- SAWAYA, A. C. H. F.; BARBOSA DA SILVA CUNHA, I.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of brazilian propolis. **Chem. Cent. J.**, v.5, n.1, p.27, 2011.
- SENTHILKUMAR, K.; ARAVINDHAN, V.; RAJENDRAN, A. Ethnobotanical survey of medicinal plants used by Malayali tribes in Yercaud hills of Eastern Ghats, India. **J. Nat. Remedies**, v.13, n.2, p.118–132, 2013.
- SFORCIN, J.M.; FERNANDES JUNIOR, A.; LOPES, C.A.M., FUNARI, S.R.C.; BANKOVA, V. Seasonal effect of brazilian propolis on *Candida albicans* and *Candida tropicalis*. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.7, p.139-144, 2001.
- SHARMA, A.; CHIBBER, S.S.; CHAWALA, H.M. Isocaviudin, a new isoflavone glucoside isolated from *Dalbergia sissoo*. **Ind J Chem.**, v.19B, p.237238, 1980.
- SHARMA, V.; JANMEDA, P. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia neriifolia* leaves. **Arabian J. Chem.** 2014; <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2014.08.019>
- SILVA, F. H. M.; SANTOS, F.A.R. Pollen morphology of the shrub and arboreal flora of mangroves of northeastern Brazil. **Wetl Ecol Manag.**, v.17, p.423-443, 2009.
- SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v.5, n.3, p.313–316, 2008.
- SILVA, E.L. Estudo químico-biológico de *Dalbergia miscolobium* Benth (Fabaceae). 2013. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, 2013.
- SIQUEIRA, A.L.; DANTAS, C.G.; GOMES, M.Z.; PADILHA, F.F.; ALBUQUERQUE JÚNIOR, R.L.C.; CARDOSO, J.C. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. **Rev. Odontol. UNESP.**, v.43, n.6, p.359-366, 2014.
- SKOULA, M.; HILALI, I. E.; MAKRIS, A. M. Evaluation of the genetic diversity of *Salvia fruticosa* Mill. Clones using RAPD markers and comparison with the essential oil profiles. **Biochem. System. Ecol.**, v.27, p.559-568, 1999.

- SONGSIANG, U.; WANICH, S.; PITCHUANCHOM, S.; NETSOPA, S.; UANPORN, K.; YENJAI, C. Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. **Fitoterapia**, v.80, p.427-431, 2009.
- STICHER, O. Natural product isolation. **Nat. Prod. Rep.**, v.25, n.3, p.517-54, 2008.
- TAO, Y.; WANG, Y. Bioactive sesquiterpenes isolated from the essential oil of *Dalbergia odorifera* T.Chen. **Fitoterapia**, v.81, p.393-396, 2010.
- TAPPIN, M. R. R.; LUCCHETTI, L. Sobre a legislação de registro de fitoterápicos. **Revista Fitos**, v.3, n.1, 2007.
- TAROLA, D.C; MAGRO, T.C; SCHILING, A.C. Impacts associated with trampling on tropical sand dune vegetation. **For. Snow Landsc. Res.**, v.81, n.1/2, p.151- 162, 2007.
- TERRA JUNIOR, O. N.; MALDONADO, J.V.; ARNOBIO, A. Estudo do desempenho comercial dos insumos farmacêuticos vegetais sob a ótica do comércio exterior. **Revista Fitos Eletrônica**, v.9, n.3, 2015.
- TESTAI, L.; MARTELLI, A.; CRISTOFARO, M.; BRESCHI, M.C.; CALDERONE, V. Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.65, p.750-756, 2013.
- TOPPA, E. V. B.; JADOSKI, C.J. O uso dos marcadores moleculares no melhoramento genético de plantas. **Scientia Agraria Paranaensis.**, v.12, n.1, p.1-5, 2013.
- TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F. R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of brazilian red propolis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v.3, p.249-54, 2006.
- UZEL, A.; SORKUN, K.; ONCAG, O.; COGULU, D.; GENÇAY, O.; SALIH, B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four diferente Anatolian propolis samples. **Microbiol. Res.**, v.160, p.189-195, 2005.
- VASCONCELOS, W.A.; BRAGA, N.M.A.; CHITARRA, V.R.; SANTOS, V.R.; ANDRADE, A.L.; DOMINGUES, R.Z. Bioactive glass-green and red propolis association: antimicrobial activity against oral pathogen bacteria. **Nat. Prod. Chem. Res.**, v.2, p.6, 2014.
- VASUDEVA, N.; MANISHA, V.; SHARMA, S.K.; SARDANA, S. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*. **Pharmacogn Rev.**, v.3, p.307-319, 2009.
- VATANPARAST, M.; KLITGÅRD, B. B.; ADEMA, F. A. C. B.; PENNINGTON, R. T.; YAHARA, T.; KAJITA, T. First molecular phylogeny of the pantropical genus *Dalbergia*: implications for infrageneric circumscription and biogeography. **S. Afr. J. Bot.**, v.89, p.143-149, 2013.
- VIEIRA, R.F.; GRAYER, R.J.; PATON, A.; SIMON, J.E. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on volatile oil constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochem. System. Ecol.**, v.29, p.287-304, 2001.
- WALDNER-TOMIC, N.M.; VANNI, R.; BELIBASAKIS, G.N.; THURNHEER, T.; ATTIN, T.; SCHMIDLIN, P.R. The in vitro antimicrobial efficacy of propolis against four oral pathogens: a review. **Dent. J.**, v.2, p.85-97, 2014.

WANG, H.; MEI, W.L.; ZENG, Y.B.; ZUO, W.J.; GUO, Z.K.; CHEN, L.L.; ZHONG, H.M.; DAI, H.F. Phenolic compounds from *Dalbergia odorifera*. **Phytochem Lett.**, v.9, p.168–173, 2014.

WATERMAN, P. G.; MOLE, S. Analysis of phenolic plant metabolites. Blackwell Scientific Publications. Oxford. 1994

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Regional office for the Western Pacific. The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. 12p.

XAVIER, T.F.; KANNAN, M.; AUXILIA, A. Observation on the traditional phytotherapy among the Malayali tribes in Eastern Ghats of Tamil Nadu, South India. **J. Ethnopharmacol.**, v.165, p.198–214, 2015.

YAHARA, S.; OGATA, T.; SAIJO, R.; KONISHI, R.; YAMAHARA, J.; MIYAHARA, K.; NOHARA, T. Isoflavan and related compounds from *Dalbergia odorifera*. **Ind. Chem. Pharm. Bull.**, v.37, n.4, p.979987, 1989.

YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna. **Argos Ed. Universitária**. Chapecó, 2001.

Chemical and genetic similarity between *Dalbergia ecastaphyllum* and red propolis from the Northeastern Brazil

Lucyana Santos de Mendonça-Melo¹, Everton Silva Mota¹, Begoña Giménez-Cassina López², Alexandra C.H.F. Sawaya², Lisiane dos Santos Freitas³, Sona Jain⁴, Marcus V.A. Batista¹, Edilson Divino de Araújo¹.

¹ Laboratory of Molecular Genetics and Biotechnology, Department of Biology, Federal University of Sergipe, Brazil

² Department of Plant Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Brazil.

³ Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes, Department of Chemistry, Federal University of Sergipe, Brazil.

⁴ Department of Morphology, Federal University of Sergipe, Brazil

ABSTRACT

Dalbergia ecastaphyllum was named the botanical origin of the Brazilian red propolis by chemical and molecular studies increasing the interest in research with this plant species. The National Institute of Industrial Property (INPI), Brazil granted the designation of origin to red propolis and red propolis extract from Alagoas state whose composition includes, among other chemical compounds, formononetin and daidzein. However, several studies have identified the chemical markers of this product in samples of *D. ecastaphyllum* and propolis of Sergipe state. The objective of this study was to compare the chemical and genetic identity between *D. ecastaphyllum* populations and propolis from the north bank of the São Francisco river and the south bank of the river also known as the lower São Francisco region. *D. ecastaphyllum* samples and propolis from this region showed similar chromatographic profiles and ESI (-) - MS fingerprints. The markers formononetin, biochanin A and daidzein were found in *D. ecastaphyllum* and propolis collected from Sergipe and Alagoas. DNA sequencing demonstrated that *Dalbergia* population from Alagoas and Sergipe are highly homogeneous, having exactly the same haplotype. Thus *D. ecastaphyllum* from the lower São Francisco have the same genetic characteristics and chemical profiles including the chemical markers considered for propolis from Alagoas, asking for more comparative studies between propolis produced in the northeastern region of Brazil with the possible extension of geographical indication to other states as well.

KEY-WORDS: marker, bioactive compound, designation of origin, identity.

1. Introduction

Brazil and Cuba are the only two countries known to produce red propolis and in Brazil its production is confined to the Northeastern states. Chemical and molecular studies have confirmed *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub. (Fabaceae) as the botanical origin of Brazilian red propolis and this has increased the interest of researchers all over the world to investigate more deeply this plant species (SILVA et al., 2008; DAUGSCH et al., 2008; JAIN et al., 2014).

The National Institute of Industrial Property (INPI, Brazil) recognized in July of 2012, under the number IG201101, the name " Mangroves of Alagoas " region comprised by the coastal and estuarine – in the state of Alagoas as Geographical Indication for red propolis and propolis extract whose composition presents, among other chemical compounds, formononetin, daidzein and isoliquiritigenin markers, thus granting the designation of the origin for this product to the state of Alagoas (SANTA RITA et al., 2013). This designation is a certification that recognizes products whose qualities or characteristics are essentially or exclusively due to the geographical environment, including natural and human factors and whose production, processing and preparation take place in a defined geographical area (VALENTE et al., 2012).

ITS (Internal Transcribed Spacer) stands out for a rapidly evolving region, which represents an important marker in order to reconstruct the molecular phylogeny of plants in the level of Species, Genus or Family (FANTACCIONE et al., 2008). These regions (ITS1 and ITS2) are located in between the 18S and 26S ribosomal regions. These spacers are separated by a conservative ribosomal region, 5.8S. According to Young & Coleman (2004), the existence of this region makes the use of this region (ITS1, 5.8S, and ITS2) very flexible and powerful. According to Vatanparast et al. (2013), the ITS region provides sufficient phylogenetic signal in species of *Dalbergia*.

In the last twenty years, high-performance liquid chromatography and gas chromatography were considered as rapid and reliable methods for obtaining the plant extracts fingerprint (XIE et al., 2005). In present day, the search for faster methods to characterize different samples, has led to the use of mass spectrometry techniques for the determination of fingerprints (SAWAYA et al., 2011; LÓPEZ et al., 2014). According to Sawaya et al. (2004), ESI - MS method of fingerprint in negative mode is capable of typing different samples, determining origin and revealing characteristic details of chemical compounds.

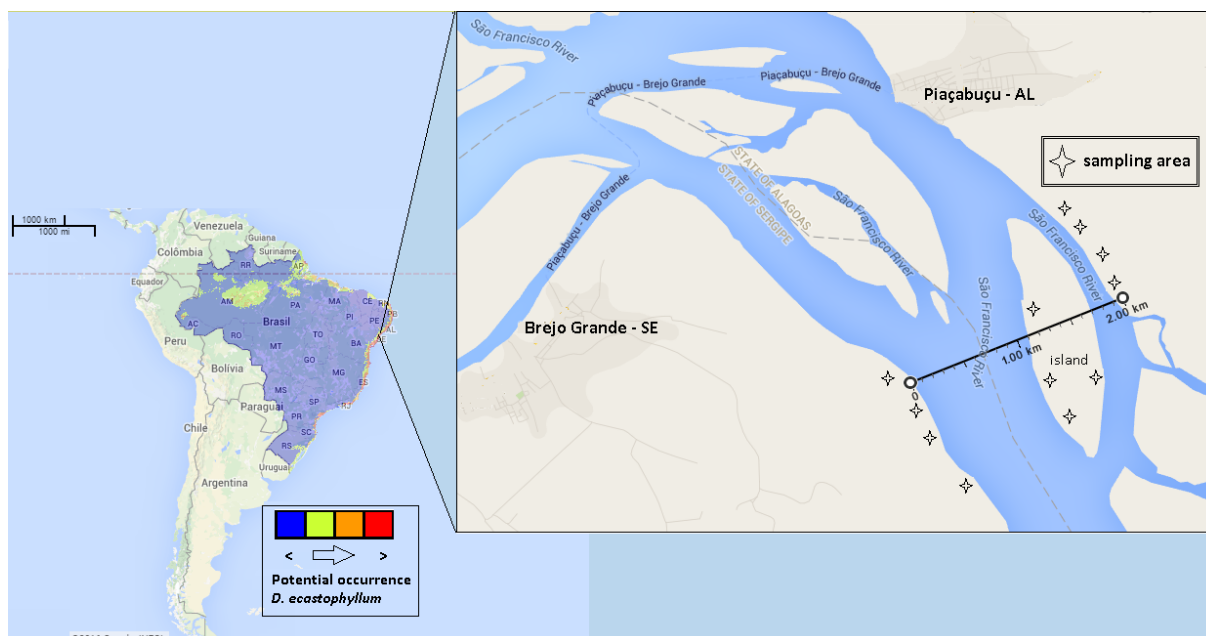
Several published reports describe isoflavones as the main constituents of *D. ecastaphyllum*, found almost exclusively in the family Fabaceae (DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008; LÓPEZ & SAWAYA 2012). Dausch et al. (2008) comparing propolis and *D. ecastaphyllum* from Alagoas confirmed the presence of these compounds in both samples. Despite the designation of origin of Alagoas propolis several studies have identified the chemical markers of this product in *D. ecastaphyllum* samples and propolis of Sergipe (LÓPEZ et al., 2014; JAIN et al., 2014; MENDONÇA et al., 2015). Thus, the objective of this study was to compare the genetic and chemistry identity *D. ecastaphyllum* populations from the north bank of the River (Alagoas state) and the South bank of the river (Sergipe state) also known as the lower São Francisco region.

2. Material and Methods

2.1 *D. ecastaphyllum* samples

D. ecastaphyllum samples were collected from the south bank of the river São Francisco in the municipality of Brejo Grande, Sergipe (S 10°46'22" W 36°43'54") 2 Km from the apiary Capivara; from an island (S 10°45'16" W 36°42'58"); and from the northern bank of the river in the state of Alagoas (S10°43'79" W 36°41'94"); as shown in the Figure 1. Specimens were prepared and deposited in the herbarium of the Federal University of Sergipe under number 19310. A total of 72 leaf samples were used for DNA extraction and molecular analysis using primer pairs ITS5-ITS4 for amplify complete sequence of ITS (ITS1, 5.8S and ITS2). For chemical analysis, bark samples from different locations (Sergipe, Alagoas and Island) and the propolis from rational box installed in the apiary Capivara (S 10°28'25" W 36°26'12"), Sergipe were used.

Figure 1: Distribution potential of *Dalbergia ecastaphyllum* and detail of the sampling region. In the legend, the color red refers to the region with higher incidence of *D. ecastaphyllum* in Brazil and the blue color refers to regions with lower probability of occurrence (LIMA, 2014).



2.2. Ethanol extract of *D. ecastaphyllum*

Bark samples were dried in a forced air oven at 40°C until complete dehydration, and then they were reduced to powder using a slicer. The extracts were prepared according to Mendonça et al. (2015), with modifications. In short, 2g of each sample was subjected to extraction with 70% ethanol (25mL) at room temperature for 1h in ultrasonic bath with agitation every 10 min. After extraction, the mixture was centrifuged and the supernatant was evaporated under reduced pressure to give the ethanol extract of *D. ecastaphyllum* (EED) which was used for chromatographic analyses.

2.3 Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography (RP- HPLC)

The chromatographic analyses of the ethanolic extracts (25 mg/mL) were performed on a HPLC Shimadzu Co Prominence model, consisting of autosampler, binary pump (LC-20AT), column oven (CTO-20A) and DAD detector diodos (SPD-M 20A). The measurement was performed according to the method described by Cabral et al. (2009) and Alencar et al. (2007) with modifications: flow rate 1.0 mL/min; temperature 35°C; column: Phenomenex (Luna 5u C18(2) 100A, 250 x 4,6mm); injection volume, 20 µL; mobile phase, A=5% acetic acid (aq), B =metanol; gradient elution, 10-20% B, 0-10min; 20-60% B, 65 min; 80% B, 70min; 80% B, 75min; 20% B, 80min; detection, diode array (k = 200 and 400 nm). All

eluents used were HPLC grade (VWR International S.A.S.). The standards used were: abscisic acid, ascorbic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid, p - coumaric acid, protocatechuic acid, trans - cinnamic acid, vanillic acid, apigenin, biochanin A, daidzein, formononetin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, kaempferol, luteolin, naringenin, quercetin, rutin and triacetin.

2.4 ESI(-)-MS fingerprints and UHPLC-ESI(-)-MS/MS

The analysis of the ethanolic solutions of the dried extracts (1 mg/mL) were performed on a UHPLC Acquity chromatographer coupled with a TQD Acquity mass spectrometer (Micromass-Waters Manchester, England), with an ESI source according to López et al. (2014). A C18 BEH Waters Acquity column (2.1 mm x 50 mm x 1.7 µm particle size) was used. Solvent A was mili-Q purified water with 0.1% formic acid and solvent B was methanol. The flow rate was 0.2 mL/min and 5 µL of samples were injected; with a linear gradient starting at 40% methanol and increasing to up 100% methanol in 9 min, held until 11 min and then returning to the initial conditions, followed by column re-equilibration. ESI ionization in the negative ion mode was used under the following conditions: Capillary -3.00 kV, Cone -30 V, Source Temperature 150°C, Desolvation Temperature 350°C and Collision Energy 30 V, acquiring data between 100 and 800 m/z.

2.5 DNA extraction and PCR

Was used 150g of leaf sample to extract the genomic DNA using the method described by Doyle and Doyle (1990). The extracted DNA was dissolved in 50 µL of TE, quantified using spectrophotometer and stored at -20°C for further use. To amplify the complete ITS sequence, ITS5-ITS4 primer pairs (WHITE et al., 1990) were used. PCR was performed using the following conditions: 2 min initial denaturation at 95°C, followed by 35 amplification cycles of 45 sec denaturation at 95°C, 1 min annealing at 50°C, 1 min extension at 72°C, and a final 10 min extension at 72°C. PCR products were stained with the nucleic acid gel staining dye, Diamond™ Nucleic Acid Dye (Cat.#H1181), electrophoresed on 1.5% agarose and visualized under UV.

2.6 DNA sequencing

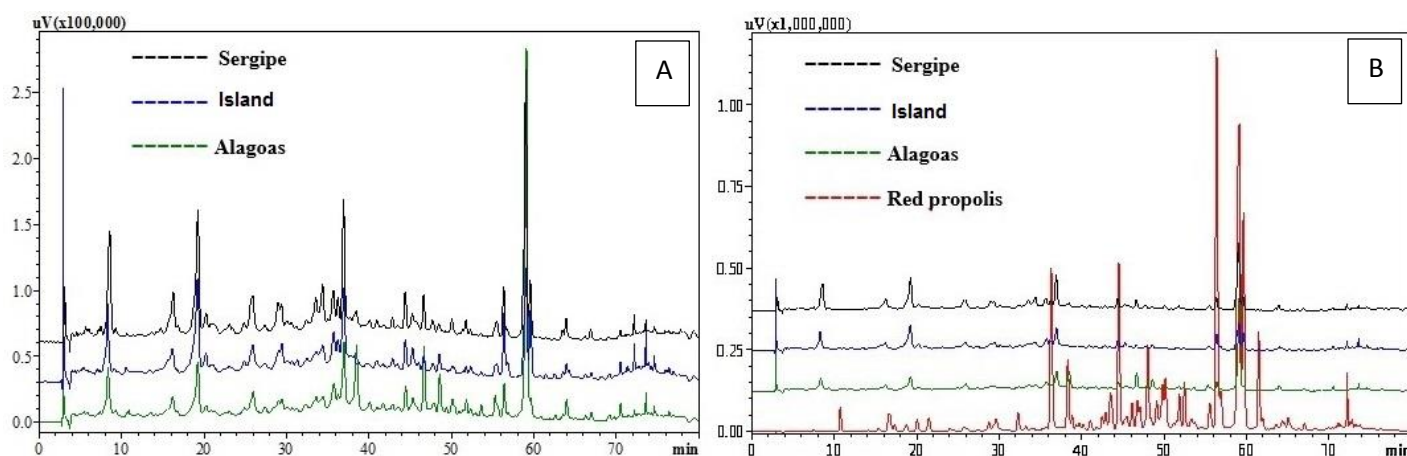
PCR-amplified DNA bands were purified using Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System kit (Promega, USA), quantified and sequenced. Sequencing reactions were carried out with the ABI PRISM BigDye® Terminator Cycle Sequencing V.3.1 kit (Applied Biosystems). The amplified products were directly sequenced using an ABI 3500 Genetic

Analyzer (Applied Biosystems). Sequencing quality and contig assembly were assessed using Pregap4 and Gap4 programs, which are part of the Staden package (STADEN, 1996). Only sequences with Phred value above 30 were considered for the contig assembly. Local sequence alignments were carried out to determine the sequence identity when compared to other sequences from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>), using nucleotide BLAST with default parameters (ALTSCHUL et al., 1990). The obtained nucleotide sequences were aligned using Muscle (EDGAR, 2004) incorporated in MEGA software version 7.0 (KUMAR et al., 2016). A genetic distance matrix was constructed in order to observe the genetic relationships among the three sampling locations using MEGA software version 5.0 (TAMURA et al., 2011).

3. Results and Discussion

HPLC chromatograms of the samples are shown in Figure 2. The chromatographic profiles of *D. ecastaphyllum* samples from the lower São Francisco region were found to be very similar (Figura 2A). The HPLC chromatogram of propolis compared with the plant species showed similarity in some peaks, but quantity and intensity were much elevated than the plant samples (Figura 2B), which was expected as propolis is a complex mixture of plant resins, enzymes and beeswax (BANKOVA, 2000; DAUGSCH et al., 2008).

Figure 2: RP-HPLC profiles. A: Comparison between *D. ecastaphyllum* samples; B: Comparison between *D. ecastaphyllum* and red propolis from Sergipe.



ESI(-)-MS Fingerprint of *D. ecastaphyllum* (Figura 3) samples showed similar composition profiles. Propolis possesses m/z 239, 255, 271 ou 283 ions which are also present in *D. ecastaphyllum*, although the ionization intensities vary between samples. However, propolis also has ions (for example, m/z 299 or m/z 301 ions) that are not present in *D.*

ecastaphyllum. Chromatographic analyzes by UHPLC-MS along with the analysis of fragmentation profiles allowed the identification of pinocembrine, biochanin A, daidzein and formononetin whose presence in propolis from Sergipe has already been linked to *D. ecastaphyllum* (LÓPEZ et al., 2014). In this study, although the formononetin and biochanin A were found in all samples of *D. ecastaphyllum*, daidzein was not found in the bark sample of *D. ecastaphyllum* from the island and pinocembrine was not found in the bark of *D. ecastaphyllum* collected in Alagoas (Figure 4 and Figure 5). These isoflavone markers have been identified in propolis from different Brazilian states (Alagoas, Sergipe and Paraíba), and in *D. ecastaphyllum* from Paraíba state (about 404 Km North of the Lower São Francisco region) and from Alagoas state (SILVA et al, 2008; LÓPEZ et al, 2014). Our results show that these markers are also found in *D. ecastaphyllum* from Sergipe state.

Figure 3: ESI(-) –MS fingerprint of the *D. ecastaphyllum* and red propolis from Sergipe.

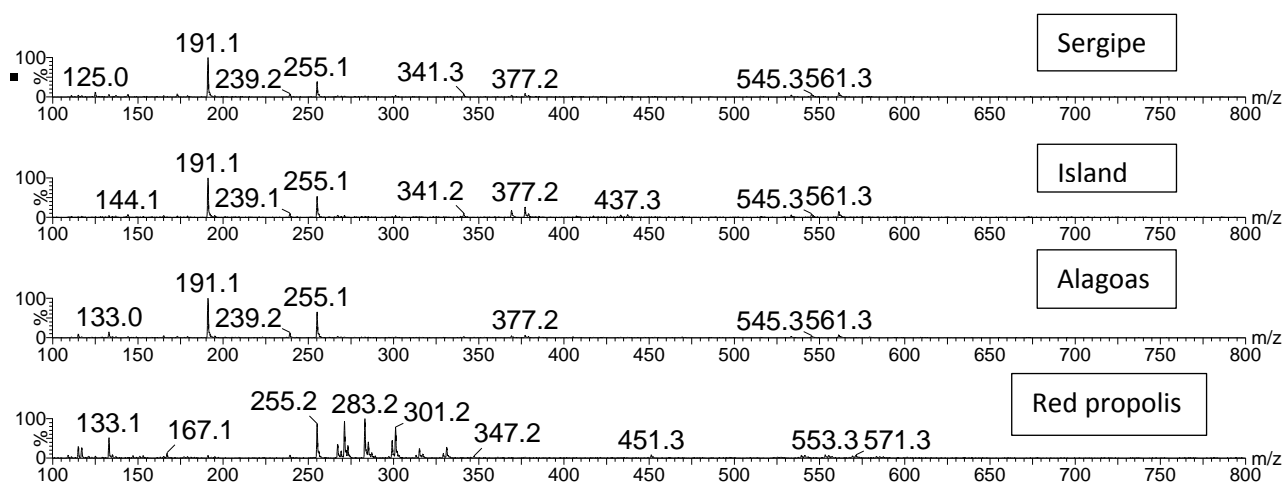


Figure 4: UHPLC-MS extracted ion chromatograms of the ions m/z 267 –formononetin (A-D), m/z 283 - biochanin A (E-H), m/z 255 – pinocembrin (I-K) and m/z 253 – daidzein (L-N) in *D. ecastaphyllum* and in red propolis from Sergipe.

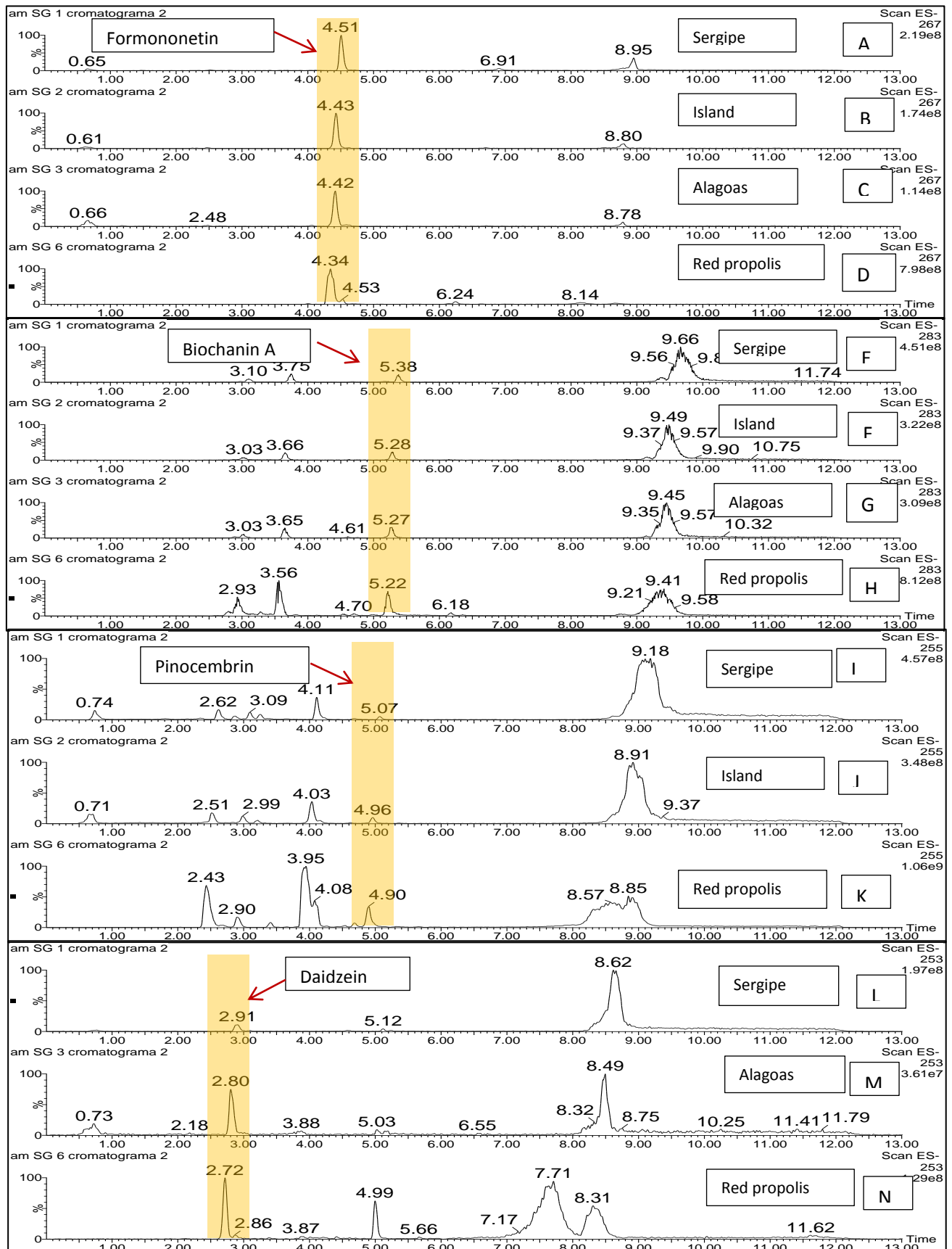
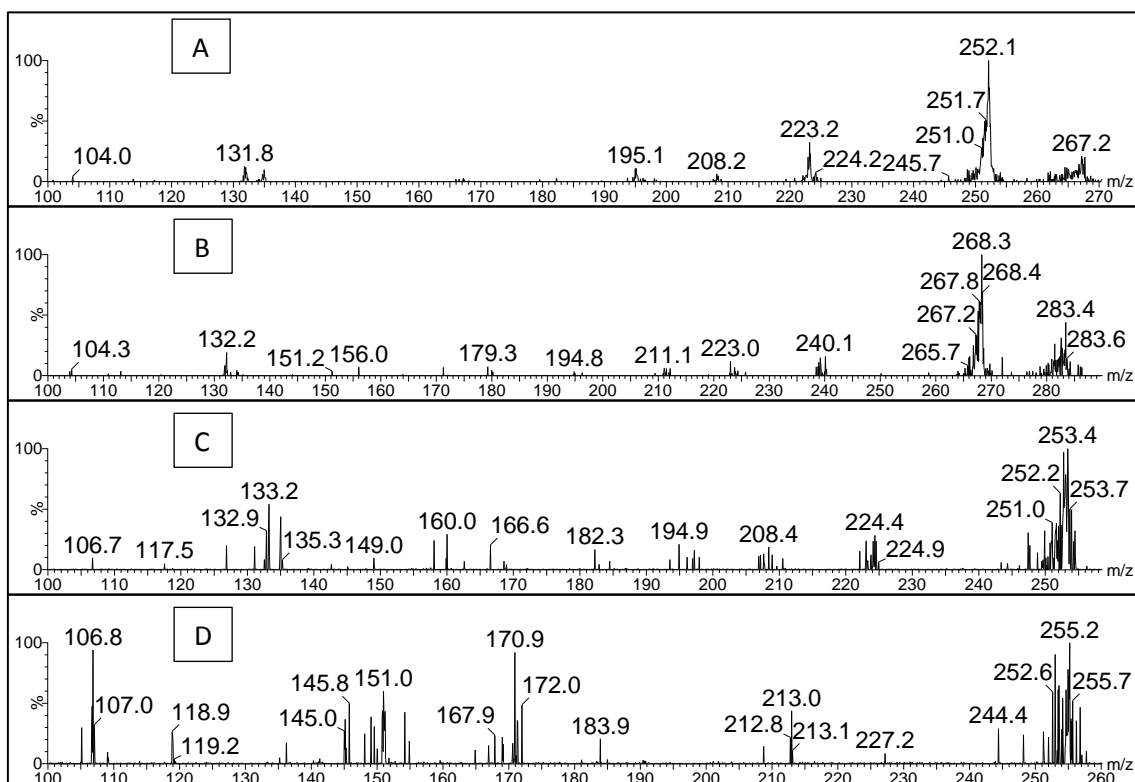


Figure 5: UHPLC-ESI(-).MS/MS of formononetin (A), biochanin A (B), daidzein (C) and pinocembrin (D) in *D. ecastaphyllum* from Sergipe.



For the assessment of genetic identity, a total of 72 *D. ecastaphyllum* samples were collected from the lower São Francisco region. Of this, 21 samples were collected from the state of Sergipe, 29 samples from the islands and 22 samples from the state of Alagoas (Figure 1). PCR analysis using DNA extracted from the leaves of the *D. ecastaphyllum* produced a single band of 700bp. Sequencing results confirmed that all the samples amplified the same region of ITS1, 5.8S and ITS2 (Table 1). Comparison of the amplified ribosomic fragments with the sequences present in GenBank showed 100% identity with ITS fragments from *D. ecastaphyllum* (Accession number KM 521373.1; KM521374.1) and *Dalbergia monetária* (Accession number KM 521385.1). However, *D. ecastaphyllum* is the only species found in the lower São Francisco region (CARVALHO, 1997). The genetic distance matrix shows that the samples from Sergipe state, Alagoas state and the islands are all identical (Table 2).

Table 1: Blast results of *D. ecastaphyllum*. Only the best blast hits are reported.

| Espécie | Genomic region | E value | Identity | Accession |
|--------------------------------|------------------------|---------|----------|-------------|
| <i>Dalbergia monetaria</i> | ITS 1, 5.8S, ITS2 | 0.0 | 100% | KM 521385.1 |
| <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> | ITS 1, 5.8S, ITS2 | 0.0 | 100% | KM 521374.1 |
| <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> | ITS 1, 5.8S, ITS2 | 0.0 | 100% | KM 521373.1 |
| <i>Dalbergia monetaria</i> | ITS 1, 5.8S, ITS2 | 0.0 | 100% | KM 521384.1 |
| <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> | 18S, ITS 1, 5.8S, ITS2 | 0.0 | 100% | AB 828628.1 |
| <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> | ITS 1, 5.8S, ITS2 | 0.0 | 100% | EF 451072.1 |
| <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> | ITS 1, 5.8S, ITS2 | 0.0 | 100% | EF 451071.1 |
| <i>Dalbergia monetaria</i> | ITS 1, 5.8S, ITS2 | 0.0 | 100% | EF 451073.1 |

Table 2: Estimates of Evolutionary Divergence over Sequence Pairs between Groups.

| Comparison between groups | | Distance |
|---------------------------|---------|----------|
| Sergipe | Island | 0.000 |
| Sergipe | Alagoas | 0.000 |
| Island | Alagoas | 0.000 |

The number of base differences per site from averaging over all sequence pairs between groups are shown. The analysis involved 41 nucleotide sequences. Codon positions included were 1st+2nd+3rd+Noncoding. All positions containing gaps and missing data were eliminated. There were a total of 486 positions in the final dataset. Evolutionary analyses were conducted in MEGA software version 5.0 (TAMURA et al., 2011).

According to Coleman (2003), in studies with plants, internal spacer region (ITS) of rRNA is most utilized for phylogenetic analysis at the genus and species level as this region is very variable compared to the 5.8S gene, which is conserved. This is in agreement with Hartvig et al. (2015) who claim that the ITS region presents higher efficiency in identifying *Dalbergia* specimens.

In the present study, we utilized the variable ITS region for *Dalbergia* where ITS1 separates 18S and 5.8S genes, and the spacer ITS2 separates 5.8S and 26S genes (VATANPARAST et al., 2013; HARTVIG et al., 2015). This region is commonly used for phylogenetic studies in related species. However, depending on the level of variation found in this region, it could also be applied to population studies. This is in accordance to Ribeiro et al. (2007), which used this region to investigate the phylogenetic relationships among different species of *Dalbergia* and different populations of *D. ecastaphyllum*.

This marker showed that the populations of *Dalbergia* from lower São Francisco are very homogeneous, having exactly the same haplotype for this region. This highlights the lack of population variation, probably due to the proximity and the form of dispersion and propagation of this plant species. Thus, even considering a highly variable marker the same haplotype was present in all the samples which leads us to the conclusion that the three sampled locations contain the same *Dalbergia* population. Therefore, according to the botanical origin, it is not prudent to differentiate the plants that are in the state of Alagoas or Sergipe. The presented genetic homogeneity also points out that any chemical differences between the samples are due to the development stage of the plant and/or depending on the environmental conditions to which the plants are submitted.

The propolis produced in the state of Alagoas has designation of origin issued by the INPI (SANTA RITA et al., 2013). This geographical indication states that only the red propolis of Alagoas and its extracts contain formononetin, daidzeína and isoliquiritigenina markers (SANTA RITA et al., 2013). However, according to the results obtained from this study, *D. ecastaphyllum* samples from both Sergipe and Alagoas have the same genetic characteristics and chemical profiles including the presence of formononetin and daidzein which are the chemical markers for Alagoan propolis.

Our group, through DNA sequencing, had already confirmed the presence of *D. ecastaphyllum* in propolis from Sergipe (JAIN et al., 2014). Considering the ease of propagation and cultivation of *D. ecastaphyllum* (MATA et al., 2014) and the presence of several markers of biotechnological interest in the extracts of this species, this study opens the possibility of obtaining bioactive molecules found in propolis directly from the extract of the inner bark of the plant.

Despite production in lower quantities, the systematic cultivation of this species can reach production volume that could supplant extraction from propolis. Moreover, bees produce propolis from different botanical origins and there is no guarantee for the presence and/or concentration of bioactive compounds due to seasonality (MENDONÇA et al., 2015).

4. Conclusion

This study using ITS marker points out the existence of a single homogeneous *D. ecastaphyllum* population in the lower São Francisco region. ESI(-)-MS analysis showed that the fingerprints for different *D. ecastaphyllum* are similar. UHPLC -MS analysis along with the MS/MS fragmentation spectra allowed the identification of formononetin, biochanin A,

pinocembrin and daidzein among these formononetin and daidzein are considered as markers for the Alagoas propolis. Thus there is a need for more comparative studies (of chemical composition in qualitative and quantitative terms, as well as the biological properties) of Alagoan red propolis with propolis of Sergipe and other regions of the northeast of Brazil, aiming the possibility of the geographical origin indication to be extended to these regions. The genetic similarity of the plants and the presence of various chemical markers of great biotechnological interest present in propolis as well as ease of propagation of this plant in the cultivation system enables the exploitation of a new way of obtaining bioactive compounds directly from extracts of the bark of *D. ecastaphyllum*.

5. Agradecimentos

CAPES by social demand for scholarship granted to the first author.

6. References

- ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I.S.; COSTA-NETO, C.M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: red propolis. **J. Ethnopharmacol.**, v.113, n.2, p.278–283, 2007.
- ALTSCHUL, S. F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D. J. Basic local alignment search tool. **J. Mol. Biol.**, v.215, n.3, p.403–410, 1990.
- BANKOVA, V.; CASTRO, S.L.D.; MARCUCCI, M.C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v.31, p.3–15, 2000.
- CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**, v.32, n.6, p.1523–1527, 2009.
- CARVALHO, A.M. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergieae) in Brazil. **Brittonia**, v.49, n.1, p.87–100, 1997.
- COLEMAN, A. W. ITS2 is a double-edged tool for eukaryote evolutionary comparisons. **Trends in Genet.**, v.19, n.7, p.370–375, 2003.
- DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis - chemical composition and botanical origin. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v.5, n.4, p.435–441, 2008.
- DOYLE, J.J.; DOYLE J.L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. **Focus**, v.12, p.13–15, 1990;
- EDGAR, R. C. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Res.**, v.32, n.5, p.1792–1797, 2004.
- FANTACCIONE, S.; WOODROW, P.; PONTECORVO, G. Molecular authentication of three Italian melon accessions by ARMS-PCR and ITS1 (Internal Transcribed Spacer 1) secondary structure prediction. **Bioinformation**, v.2, n.7, p.311–315, 2008.

- HARTVIG, I.; CZAKO, M.; KJAER, E. D.; NIELSEN, L. R.; THEILADE, I. The use of DNA barcoding in identification and conservation of rosewood (*Dalbergia* spp.). **PLoS ONE**, v.10, n.9, 2015.
- JAIN, S.; MARCHIORO, G.; MENDONÇA, L.; BATISTA, M.; ARAUJO, E. Botanical origin of the brazilian red propolis: a new approach using DNA analysis. **J. Apic. Sci.**, v.58, n.2, p.79–85, 2014.
- KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0. **Mol. Biol. Evol.**, (accepted). 2016.
- LIMA, I.B. 2014. *Dalbergia ecastaphyllum* (v1) in Biogeografia da Flora e dos Fungos do Brasil. INCT Herbário Virtual (<http://biogeo.inct.florabrasil.net/proc/2291>).
- LÓPEZ, B.G.C.; SAWAYA, A.C.H.F. A review of the plant origins, composition and biological activity of red propolis. In R. E. Goncalves & M. Cunha Pinto (Eds.), Natural products: Structure, bioactivity and applications. **Nova Science Publishers**. p.83–96, 2012.
- LÓPEZ, B. G. C.; SCHMIDT, E. M.; EBERLIN, M. N.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red propolis. **Food Chem.**, v.146, p.174–180, 2014.
- MATA, V.P.; COSTA, M.A.P.C.; MORAIS, D.V.; CARVALHO, C.A.L. Germinação de sementes de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taubert sob diferentes temperaturas. Enciclopédia biosfera, **Centro Científico Conhecer**, v.10, n.18, p.1832, 2014.
- MENDONÇA, L.S.; MENDONÇA, F.M.R.; MAIA-ARAÚJO, Y.L.M.; ARAÚJO, E.D.; RAMALHO, S.A.; NARAIN, N.; JAIN, S.; ORELLANA, S.C.; PADILHA, F.F.; CARDOSO, J.C. Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. **Food Sci. Technol.**, v.35, n.2, p.291–298, 2015.
- RIBEIRO, R.A.; LAVIN, M.; LEMOS-FILHO, J.P.; MENDONÇA-FILHO, C.V.; SANTOS, F.R.; LOVATO, M. The genus *Machaerium* (Leguminosae) is more closely related to *Aeschynomene* Sect. *Ochopodium* than to *Dalbergia*: inferences from combined sequence data. **Syst. Bot.**, v.32, n.4, p.762–771, 2007.
- SANTA RITA, L.P.; TONHOLO, J.; SÁ, E.M.O.; UCHOA, S.B.B; SILVA, P.B.B.; ALBUQUERQUE, P.P.; BENTES, A. Indicação geográfica da própolis vermelha de Alagoas: antecedentes e a propriabilidade em um sistema setorial de inovação. 2013. Disponível em: www.altec2013.org/programme_pdf/127.pdf . Acesso em: 29/02/2016
- SAWAYA, A.C.H.F.; TOMAZELLA, D.M.; CUNHA, I.B.S.; BANKOVA, V.S.; MARCUCCI, M.C.; CUSTODIO, A.R.; EBERLIN, M.N. Electrospray ionization mass spectrometry fingerprinting of propolis. **Analyst.**, v.129, n.8, p.739–744, 2004.
- SAWAYA, A. C. H. F.; BARBOSA DA SILVA CUNHA, I.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of brazilian propolis. **Chem. Cent. J.**, v.5, n.1, p.27, 2011.
- SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, 2008; 5(3):313–316.
- STADEN, R. The staden sequence analysis package. **Mol. Biotechnol.**, v.5, n.3, p.233–241, 1996.
- TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. **Mol. Biol. Evol.**, v.28, p.2731–2739, 2011.

VALENTE, M. E. R.; PEREZ, R.; RAMOS, A. M.; CHAVES, J. B. P. Indicação geográfica de alimentos e bebidas no Brasil e na União Europeia. **Ciência Rural**, v.42, n.3, p.551-558, 2012.

VATANPARAST, M.; KLITGÅRD, B. B.; ADEMA, F. A. C. B.; PENNINGTON, R. T.; YAHARA, T.; KAJITA, T. First molecular phylogeny of the pantropical genus *Dalbergia*: Implications for infrageneric circumscription and biogeography. **S. Afr. J. Bot.**, v.89, p.143–149, 2013.

WHITE, T. J.; BRUNS, S.; LEE, S.; TAYLOR, J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis, M., Gelfand, D., Sninsky, J., White, T. (Eds.), PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. **Academic Press**, p. 315–322, 1990.

XIE, P. S. Chromatography fingerprint of traditional chinese medicine. **People's Medical Publishing House**, p.18–104. 2005.

YOUNG, I.; COLEMAN, A.W. The advantages of the ITS2 region of the nuclear rDNA cistron for analysis of phylogenetic relationships of insects: a *Drosophila* example. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v.30, p.236–242, 2004.

Phytochemical profile and fingerprinting of *Dalbergia ecastaphyllum* from Northeast Brazil

Lucyana Santos de Mendonça-Melo^{1,2}, Sona Jain³, Begoña Giménez-Cassina López⁴, Alexandra C.H.F. Sawaya⁴, Lisiane dos Santos Freitas⁵, Marcus V.A. Batista¹, Edilson Divino de Araújo¹.

¹ Department of Biology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Brazil

² Technology and Research Institute of the State of Sergipe, São Cristóvão, Brazil

³ Department of Morphology, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Brazil

⁴ Department of Plant Biology, Institute of Biology, State University of Campinas, Brazil.

⁵ Department of Chemistry, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, Brazil.

ABSTRACT

The chemical markers of red propolis are considered as the main constituents of *Dalbergia ecastaphyllum*, and have chemical and pharmacological properties of great interest for health. Therefore, the objective of this study was to use different chromatographic techniques to analyze diverse plant parts (bark, stalk, or leaf) of *Dalbergia ecastaphyllum* and confirm if they all contain the same chemical markers as found in red propolis. HPLC results showed that the different parts of the plant have similar chemical profiles. Gallic acid was identified in all plant parts, but formononetin and biochanin A were only found in the bark. The ESI(-)-MS fingerprint and UHPLC-MS analysis were more accurate, because the compounds formononetin, biochanin A and daidzein were identified in all parts of the plant. Thus as long as an efficient chromatographic method is utilized, any part of the plant could be used for the identification of chemical markers. Bark was found to be the best for the production of functional extracts as it contained the highest concentration of the bioactive compounds.

KEYWORDS: red propolis, chemical markers, HPLC, UHPLC, ESI(-)-MS fingerprint.

1. Introduction

Dalbergia ecastaphyllum (L.) Taub. (Fabaceae) was confirmed as the botanical origin of red propolis from the northeast Brazil, increasing the research interest in active compounds present in this plant species. Studies have shown that propolis from *D. ecastaphyllum* has several biological activities, such as antioxidant (MAIA-ARAÚJO et al., 2013; MENDONÇA et al., 2015a), antibacterial (DAUGSCH et al., 2008; MENDONÇA et al., 2011), antifungal (MENDONÇA et al., 2015b), leishmanicidal (ARAÚJO, 2014), and cytotoxic (MENDONÇA et al., 2015a). The main constituents of *D. ecastaphyllum* are the isoflavonoid compounds, which are found almost exclusively in Fabaceae species (DAUGSCH et al., 2008; DONNELLY et al., 1973; SILVA et al., 2008; LÓPEZ & SAWAYA, 2012). These compounds are secondary metabolites distributed in the leaves, seeds, bark and flowers of the plant (BALASUNDRAM et al., 2006), and are also found in propolis (DAUGSCH et al., 2008). According to Sharma and Janmeda (2014), secondary metabolites present in plants have chemical and pharmacological properties of interest for health, and research on these compounds represent an important strategy for the discovery and development of new medicines.

Although some compounds have a standard ISO (ISO, 2005; STODT & ENGELHARDT, 2013), there is also a standard method for the determination of isoflavones in plants. According to Sasidharan et al. (2011), the use of different chromatographic techniques to separate, identify and quantify bioactive compounds in plant species is needed. In this context, *D. ecastaphyllum* has been studied using various analytical methods, including: Reversed-Phase High-Performance Thin-Layer Chromatography (RPHPTLC), High-Performance Liquid Chromatography (HPLC), UV-VIS Spectra, Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GC-MS), High resolution and accuracy ESI(-)-FT-ICR–MS fingerprints, and Ultra-High resolution Liquid Chromatography–Mass Spectrometry (UHPLC–MS) (DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008; LÓPEZ et al., 2014).

HPLC is a well established separation technique widely used for the isolation of natural products, and it is applied as a reference tool for quality control of medicinal plants (KIM et al., 2013). Improvements in HPLC technique have been incorporated over the time, allowing faster and more efficient analyzes which makes it possible to increase the number of analyzes, the yield and cost reduction (MALDANER & JARDIM, 2012).

Recently, HPLC assay was replaced by UHPLC-MS method due to its rapid and sensitive analysis, allowing evaluation of the chemical profiles of samples and determination

of their qualitative composition, even without the use of commercial standards when done in combination with mass spectrometry (LÓPEZ et al., 2014). In this context, the objective of this study was to use different chromatographic techniques to identify which plant part (bark, stalk, and leaf) of *Dalbergia ecastaphyllum* presents the chemical markers for propolis. This knowledge is essential for the development of standardized extracts production strategies, performance evaluation and production costs, which are the key factors for the biotechnology industry.

2. Material and Methods

2.1 *D. ecastaphyllum* samples

Bark, stalk, and leaf samples were collected from the banks of São Francisco River in the municipality of Brejo Grande/SE (S10°46'22" W36°43'54") Herbarium specimens were prepared and deposited in the Herbarium of the Federal University of Sergipe, under number 19310.

2.2 Ethanol extracts of *D. ecastaphyllum* (EED)

Samples, in triplicate, were submitted to drying using a forced air oven at 40°C until complete dehydration, and then they were reduced to powder using a slicer. Extracts were prepared according to Mendonca et al. (2015b), with modifications. In short, 2g of each sample was subjected to extraction with 70% ethanol (25mL) at room temperature for 1h in ultrasonic bath with agitation every 10 min. After the extraction, the mixture was centrifuged and the supernatant evaporated under reduced pressure to yield the DSE, which were prepared with 70% ethanol.

2.3 Purification of EED

The extraction was performed using the methods described by Silva et al. (2013), with the following modifications: 5 mL of EED were individually homogenized with 5g of XAD-2 Amberlite resin for 10 min, with the aid of a glass cane. The particles of the Amberlite resin were then packed into a glass column (20 mm x 400 mm), washed with acidified water (pH 2 with HCl, 25 mL), and subsequently rinsed with ultra-pure water (25 mL) to remove all sugars and other polar components (FERRERES et al., 1996). The samples were then filtered through glass wool to remove any solid particles. Phenolic compounds were eluted in 50 mL HPLC grade methanol. Methanol extracts were concentrated under vacuum at 40°C using rotary evaporator. After further treatment, the residue was dissolved in 5 mL of distilled and ultrapure water, using 5 mL of ethyl acetate to capture phenols. The solvent was vacuum

removed. The residue was dissolved in 2 ml of HPLC grade methanol, filtered (Millipore, 13 mm, 0.45 pore size), and packed in vials for subsequent chromatographic analysis.

2.4 HPLC

The chromatographic analysis of the ethanolic extracts (25 mg/mL) were performed on a HPLC Shimadzu Co Prominence model, consisting of autosampler, binary pump (LC-20AT), column oven (CTO-20A) and DAD detector (SPD-M 20A). The measurement was performed according to the method described by Cabral et al. (2009) and Alencar et al. (2007), with modifications: flow rate, 1.0 mL/min; temperature, 35°C; column: Phenomenex (Luna 5u C18(2) 100A, 250 x 4,6mm); injection volume, 20 µL; mobile phase, A=5% acetic acid (aq), B =metanol; gradient elution, 10-20% B, 0-10min; 20-60% B, 65 min; 80% B, 70min; 80% B, 75min; 20% B, 80min; detection, diode array (λ = 200 and 400 nm). All eluents used were HPLC grade (VWR International S.A.S.). The standards used were: abscisic acid, ascorbic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, ferulic acid, gallic acid, p-coumaric acid, protocatechuic acid, trans-cinnamic acid, vanillic acid, apigenin, biochanin A, daidzein, formononetin, liquiritigenin, isoliquiritigenin, kaempferol, luteolin, naringenin, quercetin, rutin, and triacetin.

2.5 ESI(-)-MS fingerprints and UHPLC-ESI(-)-MS/MS

The analysis of ethanolic solutions of the dried extracts (1 mg/mL) were performed on a UHPLC Acquity chromatographer coupled with a TQD Acquity mass spectrometer (Micromass-Waters Manchester, England), with an ESI source, according to López et al. (2014). A C18 BEH Waters Acquity column (2.1 mm x 50 mm x 1.7 µm particle size) was used. Solvent A was mili-Q purified water with 0.1% formic acid and solvent B was methanol. The flow rate was 0.2 mL/min and 5 µL of samples were injected; with a linear gradient starting at 40% methanol and increasing to up 100% methanol in 9 min, held until 11 min and then returning to the initial conditions, followed by column re-equilibration. ESI ionization in the negative ion mode was used under the following conditions: Capillary -3.00 kV, Cone -30 V, Source Temperature 150°C, Desolvation Temperature 350°C and Collision Energy 30 V, acquiring data between 100 and 800 m/z. The UHPLC - MS / MS of all samples was performed in comparison with commercial standards chrysin, kaempferol, quercetin, pinocembrin, formononetin, biochanin A, and daidzein.

3. Results

HPLC results showed that different parts of the plant have similar chemical profiles, as can be seen in Figure 1. By this technique, it was possible to identify some phenolic compounds such as abscisic acid, trans-cinnamic acid, and gallic acid. Gallic acid was found in all samples, but the compounds considered as propolis markers isoflavones formononetin (2548 $\mu\text{g/g}$) and biochanin A (25 $\mu\text{g/g}$) were found only in the bark of the plant. Daidzein could not be identified using this technique. Naringerin was also not identified in the bark of *D. ecastaphyllum*, unlike isoliquiritigenina, which was only found in this part of the plant. These compounds were quantified as shown in Table I.

Figure 1: HPLC chromatogram overlay of the different plant parts.

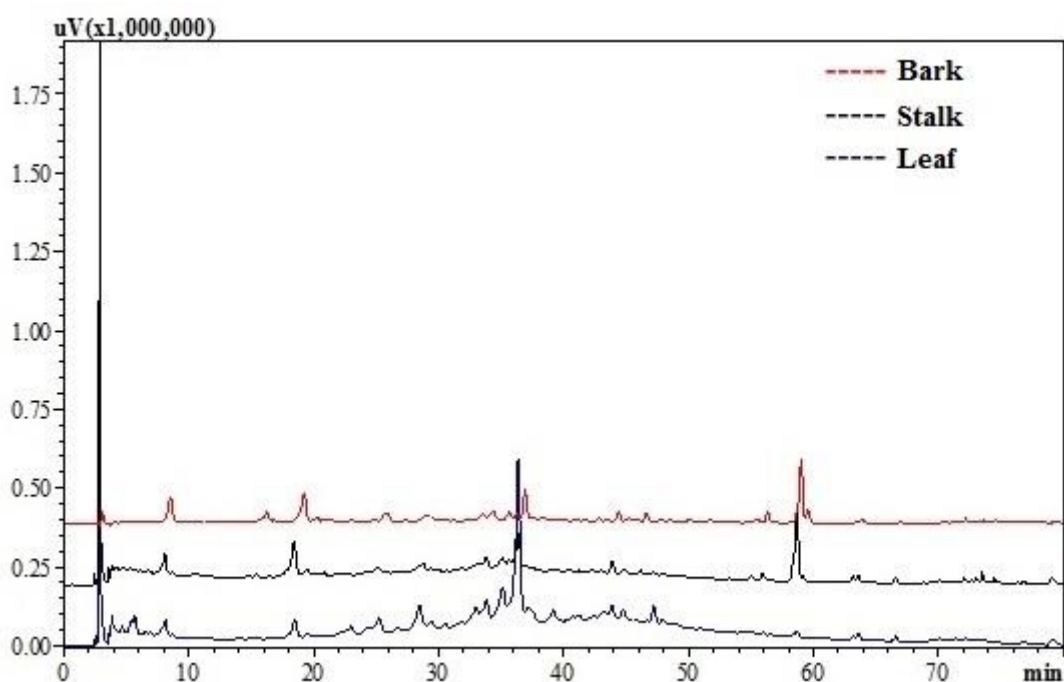


Table I: Quantification of compounds found in different plant parts of *D. ecastaphyllum* by RP-HPLC

| Compounds | Samples ($\mu\text{g} / \text{g}$) | | |
|-----------------------|--------------------------------------|-------|------|
| | Bark | Stalk | Leaf |
| Gallic acid | 348 | 487 | 6777 |
| Absciscic acid | Ni | Ni | 385 |
| Trans – Cinnamic acid | 14 | Ni | Ni |
| Naringerin | Ni | 433 | 305 |
| Isoliquiritigenin | 373 | Ni | Ni |
| Formononetin | 2548 | Ni | Ni |
| Biochanin A | 25 | Ni | Ni |

Ni: Not identified.

The similarity in the composition profile of samples was confirmed by the ESI(-)-MS fingerprint (Figure 2) and UHPLC -MS (Figure 3). However, the identification of marker compounds was more accurate in UHPLC technique over HPLC. Chromatographic analyzes by UHPLC-MS along with the analysis of fragmentation profiles allowed the identification of formononetin, biochanin A, and daidzein markers in all samples (Figures 4, 5, and 6). Pinocembrine, was found everywhere but the leaves of *D. ecastaphyllum* (Figure 7).

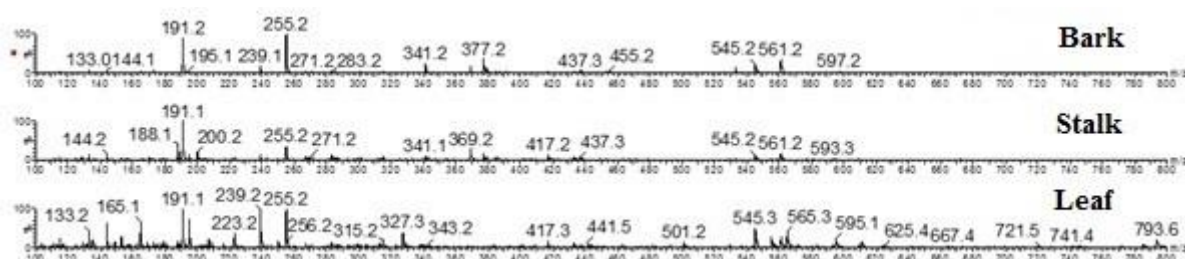
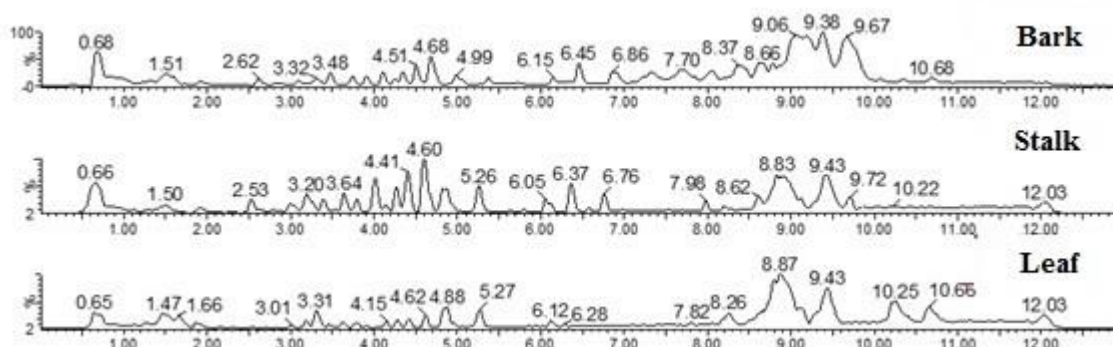
Figure 2: ESI(-) –MS fingerprint of different plant parts of *D. ecastaphyllum*.**Figure 3:** Assessment of the composition of plant parts of *D. ecastaphyllum* by UHPLC-MS.

Figure 4: ESI(-)-MS/MS analysis. Ion cluster m/z 267 (Formononetin) was found in all the analyzed samples.

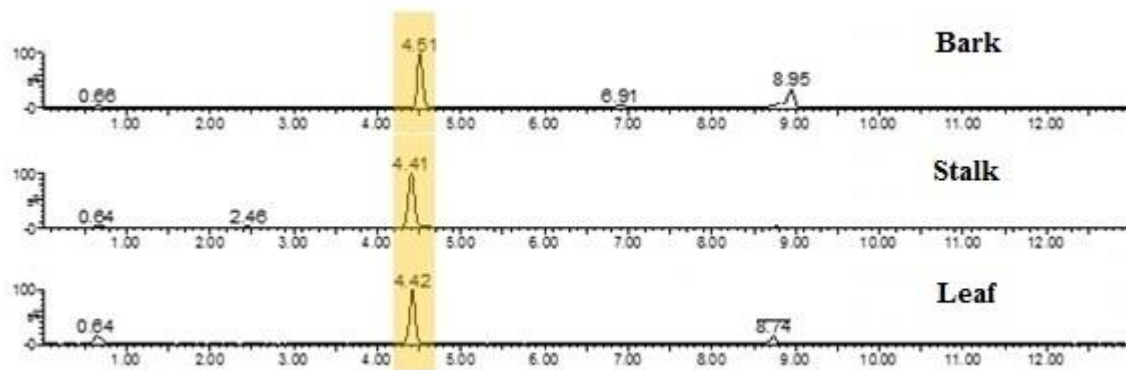


Figure 5: ESI(-)-MS/MS analysis showing ion cluster m/z 283 (Biochanin A) in all samples of *D. ecastaphyllum*.

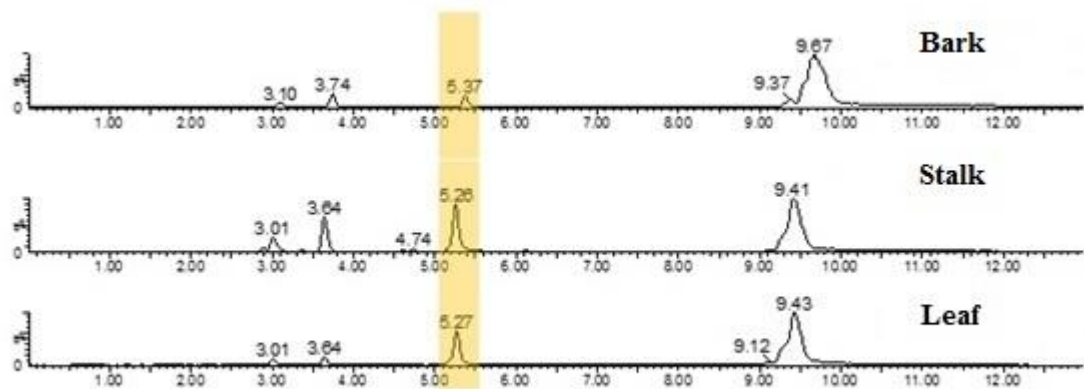


Figure 6: ESI(-)-MS/MS analysis showing ion cluster m/z 253 of Daidzein.

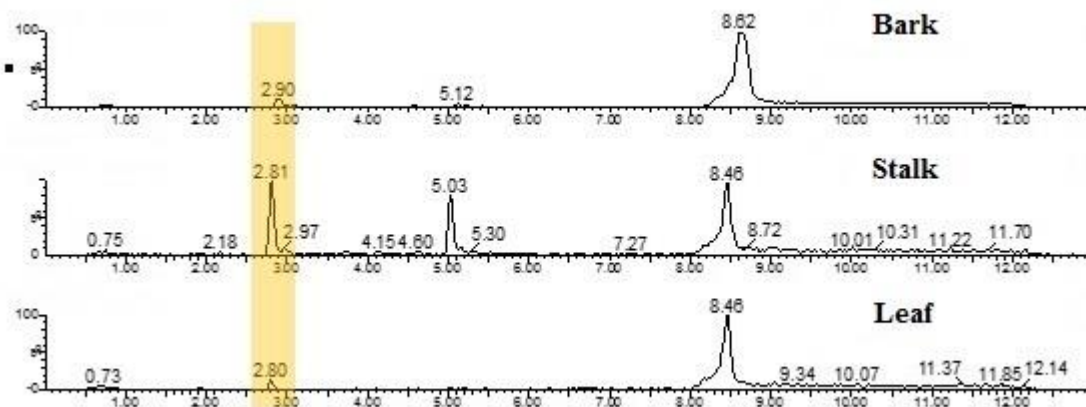
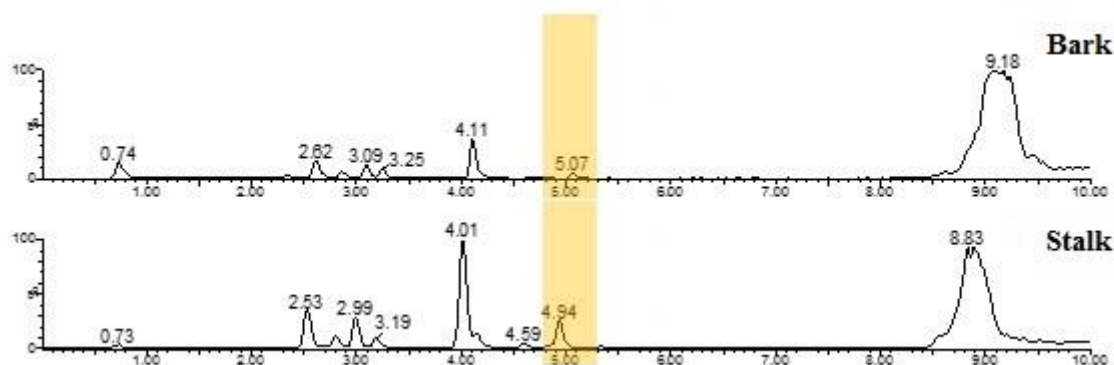


Figure 7: ESI(-)-MS/MS analysis showing ion cluster m/z 255 of Pinocembrin.



4. Discussion

According to Maldaner & Jardim (2012), UHPLC chromatographic analysis has better resolution and detectability compared to HPLC. This is in line with the results of this study, where using HPLC, formononetin and biochanin were identified only in bark. However with the use of UHPLC-MS together with the fragmentation profile analysis they could be identified in all the plant parts. These chemical markers are isoflavones that have been identified in propolis collected from different geographical regions of the Northeastern Brazil (States of Alagoas, Sergipe, and Paraíba) and in *D. ecastaphyllum* from the States of Paraíba and Alagoas (SILVA et al., 2008; LÓPEZ et al., 2014).

The use of HPLC has provided great assistance in analyzing the chromatographic profile of extracts, making it possible to investigate the substances and/or different pharmacological activities (CIMPAN & GOCAN, 2002). In this study, HPLC results demonstrated that chemical markers are concentrated in the bark of *D. ecastaphyllum*. Further, ESI(-)-MS analysis of EED in negative ion mode provided a characteristic profile of the chemical composition which can serve as a fingerprint for *D. ecastaphyllum*, results similar to that reported earlier (LÓPEZ et al., 2014). Using ESI(-)-MS, chemical markers could be identified in all examined plant parts. According to López et al. (2014), in the ESI(-)-MS fingerprinting, several substances appear as one signal since they have the same molecular formula and hence the same cluster profile. Therefore, it is necessary to use chromatography (UHPLC) to further characterize the ion in accordance with the retention times.

The ion m/z 267 with neutral molecular formula $C_{16}H_{12}O_4$ was found in the fingerprint of all the samples (Figure 4) and may correspond to two possible structures, having the same molecular formula. These compounds are identified as dalbergina (DAUGSCH et al., 2008) and formononetin (CABRAL et al., 2009; PICCINELLI et al., 2011) in the literature and both

the compounds are chemical constituents of *D. ecastaphyllum* (DAUGSCH et al., 2008). Confirmation of the compound was made by comparison of the chromatograms and MS/MS spectra of samples with the formononetin standard.

The neutral ion fragmentation pattern m/z 283 in the samples with the molecular formula $C_{16}H_{12}O_5$ was very similar indicating that they could be the same compound (Figure 5). In the literature, several substances with this molecular mass have been identified in propolis (AWALE et al., 2008; PICCINELLI et al., 2011; RIGHI et al., 2011). The subsequent comparison of the chromatograms and MS/MS spectra of samples of *D. ecastaphyllum* confirmed the similarity of this compound with standard biochanin A. Another ion spectra that showed similar behavior in all samples was the m/z 253, with retention time equal to 2.8 min, identified as isoflavone daidzein by comparison of MS/MS spectra of samples of *D. ecastaphyllum* with the commercial standard (Figure 6).

ESI(-)-MS/MS ion m/z 255 (R_t = 4.9 min), with molecular formula $C_{15}H_{11}O_4$, had a similar fragmentation patterns in two parts of the plant (bark and stem), which suggests that they are the same substance, pinocembrine, identified in *D. ecastaphyllum* by Dausch et al. (2008). This compound was also found in propolis from Mexico (LOTTI et al., 2010), *Dalbergia odorifera* (LIU et al., 2005), *Dalbergia louvelii* (BELDJOUUDI et al., 2003), and *Dalbergia parviflora* (UMEHARA et al., 2009) (Figure 7).

Comparative analysis between *D. ecastaphyllum* and propolis from the State of Sergipe, using chromatographic techniques, has identified biochanin A, formononetin, and pinocembrine, confirming that these compounds are chemical markers of this species (LÓPEZ et al., 2014). UHPLC method has shown advantages over HPLC in terms of time of analysis, lower solvent consumption, smaller sample injection volume, and higher detectability. However, the limitation of commercial standards available for the components found in *D. ecastaphyllum* restrict their identification.

5. Conclusion

Phytochemical evaluation of *D. ecastaphyllum* provided relevant information of the types of secondary metabolites found in different parts of the plant, which shows the relevance of this study. The results are also important because it highlights the possibility of the isolation of bioactive compounds, expanding the chemotaxonomic knowledge of this species. In this study, it was observed that any part of the plant could be used in order to obtain the chemical markers for propolis. The presence of isoflavones (formononetin, biochanin A, and daidzein), and pinocembrine in *D. ecastaphyllum* increases the interest for

the pharmacological use of this plant species because of the therapeutic activities of these substances. We also suggest the use of the bark as a preferred part of the plant for the production of extracts, as the highest concentration of the compounds was found in this part of the plant.

6. Acknowledgments

CAPES for the fellowship granted to the first author.

7. References

- ALENCAR, S.M., OLDONI, T.L.C., CASTRO, M.L., CABRAL, I.S.R., COSTA-NETO, C.M., CURY, J.A., ROSALEN, P.L., IKEGAKI, M.; Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: red propolis. *Journal Ethnopharmacology*, (2007); 113(2): 278-283.
- ARAÚJO, J.M.E.; Caracterização química e atividade leishmanicida dos extratos hidroetanólicos de própolis vermelha e *Dalbergia ecastophyllum* (FABACEAE). 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Sergipe, 2014.
- AWALE, S., LI, F., ONOZUKA, H., ESUMI, H., TEZUKA, Y., KADOTA, S.; Constituents of brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, (2008); 16(1): 181-189.
- BALASUNDRAM, N., SUNDRAM, K., SAMMAN, S.; Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, (2006); 99(1): 191-203.
- BELDJOUDI, N., MAMBU, L., LABAIED, M., GRELLIER, P., RAMANITRAHASIMBOLA, D., RASOANAIVO, P., MARTIN, M. T., FRAPPIER, F.; Flavonoids from *Dalbergia louvelii* and their antiplasmodial activity. *Journal of Natural Products*, (2003); 66(11): 1447-1450.
- CABRAL, I. S. R., OLDONI, T. L. C., PRADO, A., BEZERRA, R. M. N., ALENCAR, S. M., IKEGAKI, M.; Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Química Nova*, (2009); 32: 1523–1527.
- CIMPAN, G. and GOCAN, S. Analysis of medicinal plants by HPLC: recent approaches. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, (2002); 25(13-15): 2225-2292.
- DAUGSCH, A., MORAES, C. S., FORT, P., PARK, Y. K.; Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2008); 5(4): 435–441.
- DONNELLY, D. M. X., KEENAN, P. J., PRENDERGAST, J. P.; Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. *Phytochemistry*, (1973); 12(5): 1157-1161.
- FERRERES, F., ANDRADE, P., TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (1996); 44: 2053–2056.
- ISO 14502–2 (2005) Determination of substances characteristic of green and black tea Part 2: Content of catechins in green tea. Method using high-performance liquid chromatography.

- KIM, J. H., SIM, H.J., LEE, K. R., HONG, J.; UHPLC separation of structurally diverse markers in Fangchi species. *Bull. Korean Chemical Society*, (2013); 34(3).
- LIU, R., YE, M., GUO, H., BI, K., GUO, D.A.; Liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry for the characterization of twenty-three flavonoids in the extract of *Dalbergia odorifera*. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, (2005); 19(11): 1557-1565.
- LÓPEZ, B. G. C., SCHMIDT, E. M., EBERLIN, M. N., SAWAYA, A. C. H. F.; Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry*, (2014); 146: 174–180.
- LÓPEZ, B.G.C. and SAWAYA, A.C.H.F. A review of the plant origins, composition and biological activity of red propolis. In R. E. Goncalves & M. Cunha Pinto (Eds.), *Natural products: Structure, bioactivity and applications*. Nova Science Publishers, (2012); 83–96.
- LOTTI, C., FERNANDEZ, M. C., PICCINELLI, A. L., CUESTA-RUBIO, O., HERNANDEZ, I. M., RASTRELLI, L.; Chemical constituents of red mexican própolis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2010); 58: 2209-2213.
- MAIA-ARAÚJO, Y.L.F., MENDONÇA, L.S., GUALBERTO, N.C., ORELLANA, S.C., CARDOSO, J.C., JAIN, S., ARAÚJO, E. D., NARAIN, N.; Antioxidant activity and phenolic content of the red propolis from the state of Sergipe, Brazil. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, (2015); 16: 1-5.
- MALDANER, L. and JARDIM, I. C. S. F. UHPLC – Uma abordagem atual: desenvolvimentos e desafios recentes. *Scientia Chromatographica*, (2012); 4(3): 197-207.
- MENDONÇA, I.C.G., PORTO, I.C.C.M., NASCIMENTO, T.G., SOUZA, N.S., OLIVEIRA, J.M.S., ARRUDA, R.E.S., MOUSINHO, K.C., SANTOS, A.F., BASÍLIO-JÚNIOR, I.D., PAROLIA, A., BARRETO, F.S.; Brazilian red propolis: phytochemical screening, antioxidant activity and effect against cancer cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, (2015a); 15: 357.
- MENDONÇA, L.S., MAIA-ARAÚJO, Y. L. F., ORELLANA, S. C., CARDOSO, J. C., ARAÚJO, E. D.; Influência da coloração de frações cromatográficas na atividade antimicrobiana de própolis vermelha. *Scientia Plena*, (2011); 7(10).
- MENDONÇA, L.S., MENDONÇA, F.M.R., MAIA-ARAÚJO, Y.L.F., ARAÚJO, E.D., RAMALHO, S.A., NARAIN, N., JAIN, S., ORELLANA, S.C., PADILHA, F.F., CARDOSO, J.C.; Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. *Food Science Technology*, (2015b); 35(2): 291-298.
- PICCINELLI, A. L., LOTTI, C., CAMPONE, L., CUESTA-RUBIO, O., CAMPO FERNANDEZ, M., RASTRELLI, L.; Cuban and brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, (2011); 59(12): 6484–6491.
- RIGHI, A. A., ALVES, T. R., NEGRI, G., MARQUES, L. M., BREYER, H., SALATINO, A.; Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal Science of Food and Agriculture*, (2011); 91(13): 2363–2370.
- SASIDHARAN, S., CHEN, Y., SARAVANAN, D., SUNDRAM, K.M., YOGA LATHA, L.; Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, (2011); 8(1): 1-10.

SHARMA, V. and JANMEDA, P.; Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia neriifolia* leaves. *Arabian Journal of Chemistry*, (2014); <http://dx.doi:10.1016/j.arabjc.2014.08.019>

SILVA, B. B., ROSALEN, P. L., CURY, J. A., IKEGAKI, M., SOUZA, V.C., ESTEVES, A., ALENCAR, S.M.; Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (2008); 5(3): 313–316.

SILVA, T.M.S., SANTOS, F.P., EVANGELISTA-RODRIGUES, A., SILVA, E.M.S., SILVA, G.S., NOVAIS, J.S., SANTOS, F.A.R., CAMARA, C.A.; Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *Journal of Food Composition and Analysis*, (2013); 29: 10–18.

STODT, U. and ENGELHARDT, U. H. Progress in the analysis of selected tea constituents over the past 20 years. *Food Research International*, (2013); 53: 636–648.

UMEHARA, K., NEMOTO, K., MATSUSHITA, A., TERADA, E., MONTHAKANTIRAT, O., DE-EKNAMKUL, W., MIYASE, T., WARASHINA, T., DEGAWA, M., NOGUCHI, H.; Flavonoids from the heartwood of the Thai medicinal plant *Dalbergia parviflora* and their effects on estrogenic-responsive human breast cancer cells. *Journal of Natural Products*, (2009); 72(12): 2163-2168.

Caracterização química e atividade biológica de *Dalbergia ecastaphyllum* para produção de extratos padronizados

Lucyana Santos de Mendonça-Melo¹, Lisiane dos Santos Freitas², Juliana Cordeiro Cardoso³, Edilson Divino de Araújo¹.

¹ Laboratório de Genética Molecular e Biotecnologia, Departamento de Biologia, Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

² Laboratório de Análise de Compostos Orgânicos Poluentes, Departamento de Química, Universidade Federal de Sergipe, Brasil.

³ Laboratório de Biomateriais, Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes, Brasil.

RESUMO

Por apresentar como principal constituinte os isoflavonoides, é cada vez maior o interesse biotecnológico pela espécie vegetal *Dalbergia ecastaphyllum*. A produção de um extrato padronizado desta planta pode ser uma alternativa terapêutica usada como agente antimicrobiano. Com isto, o presente trabalho tem como objetivo produzir extratos de *D. ecastaphyllum* do nordeste brasileiro, padronizá-lo em compostos fenólicos, e realizar avaliação da atividade antimicrobiana. Foram determinados os teores de fenóis totais, flavonoides, atividade antioxidante das amostras de *D. ecastaphyllum*. Análises cromatográficas foram realizadas para caracterização química e posterior atividade antimicrobiana. A análise dos fenóis e flavonoides por HPLC demonstrou uma determinação mais fiável destes compostos e do perfil químico dos extratos. Todos os extratos foram capazes de inibir o desenvolvimento das cepas clínicas *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Os compostos ácido gálico e formononetina foram identificados, quantificados e utilizados como parâmetro para padronização do extrato de *Dalbergia*. Os resultados deste estudo demonstram que nem todos os compostos presentes nos extratos possuem atividade frente aos microrganismos utilizados e que provavelmente a ação combinada entre eles diminui a potência biológica do ácido gálico. Para se obter atividade antimicrobiana efetiva nestas amostras pode se padronizar o extrato com a quantidade mínima de 1% de ácido gálico e 4% de formononetina. Embora os estudos de correlação indicassem que os compostos analisados têm atividade, será necessário avaliar a atividade destes compostos isolados para confirmar esta hipótese.

Palavras-chave: composto biativo, ácido gálico, formononetina.

1. Introdução

Dalbergia ecastaphyllum (L.) Taub. (Fabaceae) é uma espécie encontrada desde o sul da Flórida até o sul do Brasil, principalmente em áreas costeiras, como o manguezal e a restinga (MATA et al., 2014). Estudos afirmam que esta espécie é a origem botânica da própolis vermelha, produto produzido por abelhas com diversas propriedades biológicas (SILVA et al., 2008; DAUGSCH et al., 2008; MENDONÇA et al., 2011; JAIN et al., 2014; MENDONÇA et al., 2015).

Com a valorização da própolis vermelha do nordeste do Brasil, é cada vez maior o interesse biotecnológico por *D. ecastaphyllum* que tem como principais constituintes as isoflavonas, compostos encontrados quase exclusivamente nas espécies da família Fabaceae (DONNELLY et al., 1973; DAUGSCH et al., 2008; SILVA et al., 2008; LÓPEZ & SAWAYA, 2012). Estes compostos são metabólitos secundários distribuídos nas folhas, sementes, cascas e flores de plantas (BALASUNDRAM et al., 2006) e também foram encontrados em amostras de própolis (DAUGSCH et al., 2008).

Segundo Sharma & Janmeda (2014) estes metabólitos têm propriedades químicas e farmacológicas interessantes para a saúde e a investigação sobre estes compostos representam uma estratégia importante para a descoberta e desenvolvimento de novos medicamentos. Muitas espécies de *Dalbergia* são usadas na medicina popular como agentes antimicrobianos (VASUDEVA et al., 2009). Alguns estudos associam a atividade antimicrobiana de espécies deste gênero à presença de flavonoides (DEESAMER et al., 2007; NARAYANAN et al., 2007).

Motivado pela necessidade de identificar os compostos responsáveis pela atividade biológica das espécies vegetais, os métodos de análise utilizados têm evoluído na tentativa de assegurar a qualidade dos produtos fabricados (SAWAYA et al., 2011). Para usar qualquer planta no desenvolvimento da fitoterapia é essencial garantir a eficácia, segurança e reprodutibilidade da atividade farmacológica. Estes requisitos são alcançados por meio da padronização de todo o processo de produção e também a padronização dos compostos químicos (PETERS et al., 2015).

A produção de um extrato padronizado de *D. ecastaphyllum*, com eficácia e segurança de sua utilização garantida, pode ser uma alternativa terapêutica usada como agente antimicrobiano. Com isto, o presente trabalho tem como objetivo produzir extratos de *D.*

ecastaphyllum do nordeste brasileiro, padronizá-lo em compostos fenólicos, e realizar avaliação da atividade antimicrobiana.

2. Materiais e Métodos

2.1 Amostras de *D. ecastaphyllum*

Amostras de entrecasca de *D. ecastaphyllum* foram coletadas na margem sul do Rio São Francisco no município de Brejo Grande, Sergipe (S 10°46'22" W 36°43'54") a 2Km de um apiário com produção confirmada de própolis vermelha; em uma ilha (S 10°45'16" W 36°42'58"); e na margem norte do Rio no estado de Alagoas (S10°43'79" W 36°41'94"). As amostras foram preparadas e depositadas no herbário da Universidade Federal de Sergipe sob o número 19310.

2.2 Extrato etanólico de *D. ecastaphyllum* (EED)

Amostras de entrecasca de *D. ecastaphyllum* foram secas em um forno de ar forçado a 40°C até completa desidratação, e em seguida, foram reduzidos a pó utilizando um moinho de facas. Os extratos foram preparados de acordo com Mendonça et al. (2015), com as seguintes modificações: 2 g de cada amostra foi submetida a extração com etanol 70 % (25mL) à temperatura ambiente durante 1 h em banho de ultrassom com agitação a cada 10 min. Após a extração, a mistura foi centrifugada e o sobrenadante evaporado sob pressão reduzida para se obter o extrato seco. Os extratos utilizados nas análises foram ressuspensos em uma concentração de 5%.

2.3 Fenóis Totais e Flavonoides

O teor de fenóis totais nos EEDs foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON et al., 1999). Os extratos (0,5 mL) foram misturados com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10) e 2,0 mL de solução aquosa a 4% de Na₂CO₃. A absorvância foi medida a 740 nm após 2 horas de incubação à temperatura ambiente. Os EED foram avaliados a uma concentração final de 50µg/mL. O teor de fenóis totais foi expresso como mgEAG/g (equivalentes de ácido gálico). O teor de flavonoides nos extratos foi determinada usando um método descrito por Alencar et al. (2007), com modificações. Um total de 0,5 mL de EED (1:10), 1,5 mL de 95 % de etanol, 0,1 mL de 10% de AlCl₃, 0,1 mL de solução de acetato de potássio 1M e 2,8 mL de água destilada foram misturados. Após incubação de 40 min à temperatura ambiente, a absorvância foi medida a 415 nm. O teor de

flavonoides totais foram calculados como equivalentes de quercetina (mgEQ/g) a partir de uma curva padrão.

2.4 Purificação dos EED

A extração foi realizada utilizando métodos descritos por Silva et al. (2013), com a seguinte modificação: 5 mL EED foram homogeneizados individualmente com 5g de resina amberlit XAD-2 durante 10 min, com auxílio do bastão de vidro. As partículas de resina foi, em seguida, embalada em uma coluna de vidro (20 mm x 400 mm), lavou-se com água acidificada (pH 2 com HCl, 25 mL) e, subsequentemente, enxaguados com água ultrapura (25 mL) para remover todos os açúcares e outros componentes polares (FERRERES et al., 1996). As amostras foram então filtradas através de lã de vidro para remover quaisquer partículas sólidas. Os compostos fenólicos foram eluídos em 50 mL de metanol grau HPLC. Os extratos de metanol foram concentradas no rotaevaporador sob vácuo a 40°C. Após tratamento posterior, o resíduo foi dissolvido em 5 ml de água ultrapura e foi utilizado 5 ml de acetato de etila para capturar fenóis. O solvente foi removido por vácuo. O resíduo foi dissolvido em 2mL de metanol grau HPLC, filtrado (Millipore, 13 mm, tamanho de poro de 0,45) e armazenado em vials para análise cromatográfica subsequente.

2.5 HPLC

As análises cromatográficas dos extratos etanólicos (25mg/mL) foram realizadas em um HPLC Shimadzu Co modelo Prominence, consistindo de amostrador automático, bomba binária (LC-20AT), forno de coluna (CTO-20A) e detector díodos DAD (SPD-M 20A). A medição foi realizada de acordo com o método descrito por Cabral et al. (2009) e Alencar et al. (2007) com as modificações da taxa de fluxo: 1,0 mL / min; temperatura 35°C; coluna: Phenomenex (Luna 5u C18 (2) 100A, 250 x 4,6mm); volume de injeção, 20 µl; fase móvel, A = 5% de ácido acético (aq), B = metanol; gradiente de eluição, 10-20% de B, 0-10 min; 20-60% de B, 65 min; 80% de B, 70 min; 80% de B, 75 min; 20% de B, 80 min; detecção, por arranjo de díodos (k = 200 e 400 nm). Todos os eluentes utilizados foram grau HPLC (VWR International S.A.S.). Os padrões utilizados foram: ácido abscísico, ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido clorogênico, ácido ferúlico, ácido gálico, ácido p-cumárico, ácido protocatecuico, trans-cinâmico, ácido vanílico, apigenina, biochanina A, daidzeína, formononetina, liquiritigenina, isoliquiritigenina, Caempferol, luteolina, naringerina, quercetina, rutina e triacetina. Os compostos foram identificados com base no comportamento cromatográfico em comparação com padrões externos. Cada composto foi quantitativamente

analisado por uma curva padrão, construída a partir de cromatogramas HPLC dos compostos autênticos.

2.6 Determinação da atividade antioxidante pelo método ORAC_{FL}

A atividade antioxidante dos EEDs foi medida usando o teste ORAC_{FL} (capacidade absorvente do radical oxigênio) com fluoresceína como sonda fluorescente e AAPH (cloreto de (2,2'-azobis (2-amidiopropano)) como uma fonte de radicais livres. As experiências foram realizadas em placas de microtitulação de 96 poços de acordo com a metodologia descrita por Prior et al. (2003) e Ou et al., (2001). Para esta finalidade soluções estoque foram preparadas a partir de EED (50 mg.mL⁻¹), em EtOH/DMSO (50:50) e diluiu-se 100, 500, 1000, 5000 e 10000 vezes com tampão de fosfato (pH 7,05). Foi adicionado 50 µL de cada diluição nos poços com 100 µL de fluoresceína e, finalmente, 50 µL de AAPH. O Trolox (6-hidroxi-2, ácido 5,7,8- tetrametilcromano-2-carboxílico) que é um análogo da vitamina E, foi usado como substância de referência. A leitura foi realizada utilizando um filtro de fluorescência (excitação $\lambda = 485$ nm e emissão $\lambda = 528$ nm) monitorando a cinética da reação a cada 2 min durante um período de 70 minutos (temperatura = 37°C). Os resultados foram expressos como µmol de Trolox equivalente (ET) por grama de extrato (µmol ET/g). Como controle positivo foi utilizado a quercetina e como controle negativo e solução diluente.

2.7 Ensaio Biológico

Microrganismo: Cepas foram fornecidas pelo Laboratório de Biomateriais do Instituto de Tecnologia e Pesquisa, Universidade Tiradentes. Foram utilizadas duas linhagens clínicas bacterianas (*Staphylococcus aureus* (Gram +) e *Pseudomonas aeruginosa* (Gram -)).

Atividade antibacteriana: Foi realizada de acordo com Mendonça et al. (2011). Foram preparadas as suspensões das bactérias e ajustada de acordo com o padrão de turvação em comparação com a escala 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ células/ml). Método de difusão de ágar foi utilizado para a determinação das atividades antibacterianas de EED. Após a solidificação das placas à temperatura ambiente, foram feitos poços (d=5mm). Alíquotas de 40 µL de EED (50 mg.ML⁻¹) foram adicionados aos poços. As placas inoculadas foram incubadas durante 24 h a 35°C. Zonas de inibição foram expressos em (mm). Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.8 Análise estatística

Foi realizado a análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey a fim de avaliar a diferença entre os grupos. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Estas análises foram feitas usando o software Assistat 7.7 beta.

3. Resultados e Discussão

Os resultados obtidos para os teores de fenóis totais e flavonoides utilizando o método espectrofotométrico não apresentaram diferença significativa entre as amostras de *D. ecastaphyllum* das diferentes localidades como apresenta a Tabela 1. O método espectrofotométrico do cloreto de alumínio com base na reação de cor é frequentemente aplicado para a quantificação de flavonoides em extratos de própolis e é especialmente útil para a pesquisa rápida de componentes bioativos da própolis (CHANG et al., 2002; LUO et al., 2011). Entretanto, neste estudo, que utilizou a origem botânica do produto apícola, esta análise resultou em baixos teores de flavonoides.

A amostra que apresentou melhor capacidade antioxidante foi o extrato hidroalcoólico da Ilha, seguida pelas amostras de Sergipe e Alagoas (Tabela 1). Partindo do pressuposto que a *D. ecastaphyllum* é a origem botânica da própolis vermelha nossos resultados diferem dos encontrado por López (2014) que analisando amostras de própolis vermelha de Sergipe e Alagoas demonstrou maior atividade antioxidante para o produto apícola de Alagoas.

Tabela 1: Teores de Fenóis totais e Flavonoides e atividade antioxidante dos extratos

| Amostras | Fenóis totais | Flavonoides | ORAC _{FL} |
|----------|--------------------------|--------------------------|--------------------|
| | mg EAG/g of EED | mg EQ/g of EED | μmol ET/g |
| Sergipe | 1,46 ± 0,04 ^a | 0,035 ± 0,0 ^a | 1113.0 |
| Ilha | 1,43 ± 0,03 ^a | 0,037 ± 0,0 ^a | 1130.6 |
| Alagoas | 1,37 ± 0,05 ^a | 0,034 ± 0,0 ^a | 958.2 |

EAG: Equivalente de ácido gálico; EQ: Equivalente de quercetina; ET: Equivalente de trolox;

*Média dos valores da triplicata ± média DP; letras idênticas na mesma coluna são valores estatisticamente semelhantes. Foram realizados teste de Tukey com 5% de significância.

O ensaio ORAC é um método robusto que estima diretamente a capacidade antioxidante das amostras, sendo que o tempo e o grau de inibição são mensurados enquanto se produz a reação (OU et al., 2001). O ensaio ORAC baseia-se na detecção do decaimento na emissão de fluorescência devido ao dano químico que produzem as espécies reativas de oxigênio, em uma sonda fluorescente (DÁVALOS et al., 2003; PRIOR et al., 2003). Em presença de um antioxidante, há inibição da capacidade oxidante do radical, pois protege a sonda fluorescente da oxidação evitando assim a perda de fluorescência (HUANG et al.,

2002). Sendo assim, a cor vermelha do extrato não interfere na análise como acontece, por exemplo, na análise de DPPH.

A análise detalhada dos fenóis e flavonoides também foi realizada por HPLC, que proporciona uma determinação mais fiável destes compostos. Esta análise foi utilizada para determinar o perfil químico dos EED. Na figura 1, os cromatogramas representativos das amostras são apresentados e demonstram perfis muito semelhantes entre si, corroborando com os resultados espectrofotométricos. Entretanto, utilizando o método HPLC foi possível identificar e quantificar os fenóis e flavonoides que não foram identificados pelo método espectroscópico (Tabela 2). O método espectrofotométrico utilizando cloreto de alumínio não determina igualmente todos os grupos de flavonoides e pode subestimar o teor destes (CHANG et al., 2002; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2010).

Figura 1: Sobreposição dos cromatogramas das amostras de *D. ecastaphyllum*

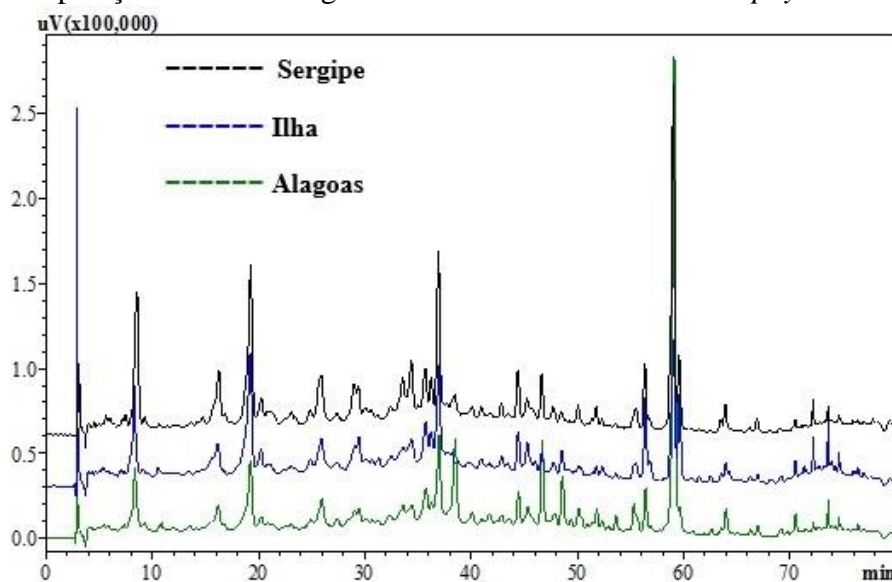


Tabela 2: Quantificação dos compostos encontrados nos extratos *D. ecastaphyllum* por HPLC

| Compostos | Amostras (µg/g) | | |
|------------------------|-----------------|------|---------|
| | Sergipe | Ilha | Alagoas |
| Ácido Gálico | 348 | 900 | 739 |
| Ácido Abscísico | Ni | 23 | 31 |
| Ácido Trans – Cinâmico | 14 | Ni | Ni |
| Naringerina | Ni | 36 | 213 |
| Isoliquiritigenina | 373 | 357 | Ni |
| Formononetina | 2548 | 1820 | 5734 |
| Biochanina A | 25 | Ni | Ni |

Ni: Não identificado.

Os compostos ácido gálico e formononetina foram identificados em todos os extratos e a isoliquiritigenina não foi detectada na amostra do estado de Alagoas. Os compostos formononetina e isoliquiritigenina são considerados marcadores químicos da própolis vermelha de Alagoas e também foram identificados em espécies de *D. ecastaphyllum* (DAUGSH et al., 2008; LÓPEZ et al., 2014).

A partir dos resultados do HPLC foi possível quantificar os compostos químicos majoritários que foram identificados em todas as amostras de *D. ecastaphyllum* estudada. Conforme a Tabela 2, estes compostos foram o ácido gálico e a formononetina na respectiva proporção de 1:8 na amostra de Sergipe e 1:9 na amostra de Alagoas. Estes marcadores foram utilizados como parâmetro para produção de extratos com teores de compostos bioativos conhecidos.

Após calcularmos a proporção dos compostos identificados observamos que as amostras de Sergipe e da Ilha possuem teores semelhantes. Entretanto, o teor dos compostos na amostra de Alagoas foi duas vezes maior (Tabela 3). A partir destes resultados foi definido qual a proporção dos dois compostos bioativos seria utilizada para determinar a padronização de futuros extratos e determinação das atividades biológicas. Partindo da proporção encontrada nos EED foi elaborada uma escala progressiva de concentração dos compostos comerciais para após o resultado das análises antimicrobiana determinar qual a melhor proporção dos marcadores deve ser utilizada para posterior produção de extratos padronizados (Tabela 4).

Tabela 3: Teores dos compostos majoritários encontrados em nas amostras

| Compostos bioativos | Sergipe | Ilha | Alagoas |
|---|---------|------|---------|
| Total de compostos ($\mu\text{g} / \text{g}$) | 3308 | 3136 | 6717 |
| Ácido Gálico (%) | 10,5 | 28,7 | 11 |
| Formononetina (%) | 77 | 58 | 85,4 |

Tabela 4: Concentração dos padrões comerciais utilizada nas análises antimicrobiana

| Concentração | Ácido Gálico (%) | Formononetina (%) |
|--------------|------------------|-------------------|
| 1:1 | 2,5 | 2,5 |
| 1:2 | 1,7 | 3,3 |
| 1:3 | 1,25 | 3,75 |
| 1:4 | 1,0 | 4,0 |
| 1:5 | 0,83 | 4,17 |
| 1:6 | 0,7 | 4,3 |

Neste estudo, observou-se que todas as amostras de *D. ecastaphyllum* foram capazes de inibir o desenvolvimento das cepas clínicas de *S. aureus* e de *P. aeruginosa*, embora as amostras apresentaram o menor desempenho inibidor para a espécie Gram negativa (Tabela 5). Não houve diferença significativa em relação à atividade antimicrobiana dos EED. Entretanto, a inibição das diferentes concentrações dos padrões (ácido gálico e formononetina) foi quase o dobro. Provavelmente, nem todos os compostos presentes no extrato possuem atividade antimicrobiana, visto que a potência de inibição dos padrões comerciais foi melhor em relação aos extratos de *D. ecastaphyllum*.

Os resultados da atividade antimicrobiana das diferentes concentrações dos padrões inferem que possivelmente o composto ácido gálico é o responsável por manter a resposta antimicrobiana (Tabela 5). Visto que, ao diminuir a concentração do ácido gálico (abaixo de 1%) mesmo aumentando a concentração da formononetina a resposta é diminuída.

Tabela 5: Atividade antimicrobiana dos extratos de *D. ecastaphyllum* e das diferentes concentrações dos compostos químicos identificados nas amostras.

| | <i>S. aureus</i> clínica | <i>P. aeruginosa</i> clínica |
|----------|--------------------------|------------------------------|
| Amostras | Zona de inibição (mm)* | |
| Sergipe | 17 ± 1,7 ^a | 13 ± 0,0 ^a |
| Ilha | 18 ± 0,0 ^a | 13 ± 0,0 ^a |
| Alagoas | 18 ± 0,0 ^a | 13 ± 0,0 ^a |
| 1 A: 1 B | 30 ± 0,0 ^a | 15 ± 0,0 ^a |
| 1 A: 2 B | 30 ± 0,0 ^a | 13 ± 0,0 ^a |
| 1 A: 3 B | 30 ± 0,0 ^a | 14 ± 1,2 ^a |
| 1 A: 4 B | 30 ± 0,0 ^a | 15 ± 0,0 ^a |
| 1 A: 5 B | 20 ± 0,0 ^b | 15 ± 0,0 ^a |
| 1 A: 6 B | 20 ± 0,0 ^b | 15 ± 0,0 ^a |

A: ácido gálico; B: formononetina;

*Média dos valores da triplicata ± média DP; letras idênticas na mesma coluna são valores estatisticamente semelhantes. Foram realizados teste de Tukey com 5% de significância.

O ácido gálico (ácido 3,4,5 - trihidroxibenzóico) é um fenol de ocorrência natural nas plantas. Consiste em uma estrutura fenólica trihidroxilada que possui várias atividades farmacológicas (SARJIT et al., 2015). Este composto tem demonstrado potencial atividade antimicrobiana frente à *Salmonella typhimurium* (NOHYNEK et al., 2006), *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (CHANWITHEESUK et al., 2007). Os derivados do ácido gálico são amplamente utilizados na indústria alimentícia, de cosméticos e farmacêutica. Alguns estudos demonstram que estes compostos apresentam potentes atividades terapêuticas incluindo propriedades anticarcinogênica, antimicrobiana, antivirais além de uma potente atividade antioxidante, atuando como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (EROs) (OW & STUPANS, 2003; SAVI et al., 2005).

4. Conclusão

Os resultados deste estudo demonstram que nem todos os compostos presentes nos extratos de *D. ecastaphyllum* possuem atividade frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa* e que provavelmente a ação combinada entre eles diminui a potência biológica. Foi observado que compostos majoritários (ácido gálico e formononetina) identificados em todas as amostras de *D. ecastaphyllum* possuem atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Entretanto, os resultados demonstram que o ácido gálico é o responsável pela atividade antimicrobiana dos extratos de *D. ecastaphyllum*, pois mesmo quando a concentração deste composto é proporcionalmente diminuída em detrimento da formononetina a atividade antimicrobiana se mantém. Provavelmente a formononetina não tem a mesma potência antimicrobiana.

Para se obter atividade antimicrobiana efetiva nestas amostras pode se padronizar o extrato com a quantidade mínima de 1% de ácido gálico e 4% de formononetina. Entretanto serão necessários mais estudos para identificar outras possíveis substâncias ativas que por ora não foram identificadas. Embora os estudos de correlação indicassem que os compostos analisados têm atividade, será necessário avaliar a atividade destes compostos isolados para confirmar esta hipótese.

5. Agradecimentos

A CAPES pela bolsa de demanda social concedida à primeira autora.

6. Referências

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L. C.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J.A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological

activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **J. Ethnopharmacol.**, v.113, n.2, p.278-283, 2007.

ALVAREZ-SUAREZ, J.M.; GONZALEZ-PARAMA, A.M.; SANTOS-BUELGA, C.; BATTINO, M. Antioxidant Characterization of Native Monofloral Cuban Honeys. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2010, 58, 9817–9824.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem.**, v.99, n.1, p.191-203, 2006.

CABRAL, I.S.R.; OLDONI, T.L.C.; PRADO, A.; BEZERRA, R.M.N.; ALENCAR, S.M. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**, v.32, n.6, p.1523-1527, 2009.

CHANG, C. C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C.; Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2002, 10 (3), 178-182.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J.D.; RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food Chem.**, v.100, p.1044-1048, 2007.

DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis - Chemical composition and botanical origin. **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.**, v.5, n.4, p.435–441, 2008.

DEESAMER, S.; KOKPOL, U.; CHAVASIRI, W.; DOUILLARD, S.; PEYROT, V.; VIDAL, N.; COMBES, S.; FINET, J.P. Synthesis and biological evaluation of isoflavone analogues from *Dalbergia oliveri*. **Tetrahedron**. v.63, p.12986-12993, 2007.

DONNELLY, D.M.X.; KEENAN, P.J.; PRENDERGAST, J.P. Isoflavonoids of *Dalbergia ecastophyllum*. **Phytochemistry**, v.12, p.1157-1161, 1973.

FERRERES, F.; ANDRADE, P.; TOMÁS-BARBERÁN, F.A. Natural occurrence of abscisic acid in heather honey and floral nectar. **J. Agri. Food Chem.**, v.44, p.2053–2056, 1996.

JAIN, S.; MARCHIORO, G.; MENDONÇA, L.; BATISTA, M.; ARAUJO, E. Botanical origin of the Brazilian red propolis: A new approach using DNA analysis. **J. Apicult. Sci.**, v.58, n.2, p.79–85, 2014.

LÓPEZ, B.G.C.; SAWAYA, A.C.H.F. A review of the plant origins, composition and biological activity of red propolis. In R. E. Goncalves & M. Cunha Pinto (Eds.), *Natural products: Structure, bioactivity and applications*. **Nova Science Publishers**. p.83–96, 2012.

LOPEZ, B.G.C. Análise da composição de amostras de própolis vermelha do Brasil por espectrometria de massas com ionização por eletrospray e cromatografia líquida de ultra-eficiência (UHPLC-ESI-MS) e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana. 2014 Dissertação (Mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, 2014.

LUO, C.; ZOU, X.; LI, Y.; SUN, C.; JIANG, Y.; WU, Z. Determination of flavonoids in propolis-rich functional foods by reversed phase high performance liquid chromatography with diode array detection. *Food Chemistry*. 2011, doi:10.1016.

- MATA, V.P.; COSTA, M.A.P.C.; MORAIS, D.V.; CARVALHO, C.A.L. Germinação de sementes de *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taubert sob diferentes temperaturas. Enciclopédia biosfera, **Centro Científico Conhecer**, v.10, n.18, p.1832, 2014.
- MENDONÇA, L.S.; MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; ORELLANA, S. C.; CARDOSO, J. C.; ARAÚJO, E. D. Influência da coloração de frações cromatográficas na atividade antimicrobiana de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v.7, n.10, 2011.
- MENDONÇA, L.S.; MENDONÇA, F.M.R.; MAIA-ARAÚJO, Y.L.M.; ARAÚJO, E.D.; RAMALHO, S.A.; NARAIN, N.; JAIN, S.; ORELLANA, S.C.; PADILHA, F.F.; CARDOSO, J.C. Chemical markers and antifungal activity of red propolis from Sergipe, Brazil. **Food Sci. Technol**, v.35, n.2, p.291-298, 2015.
- NARAYANAN, M.C.; RAO, P.R.; SHANMUGAN, N.N.; GOPALAKRISHNAN, S.M.; DEVI, K. Isolation and characterization of bioactive isoflavonoids from the roots of *Dalbergia horrida*. **Nat. Prod. Res.**, v.21, n.10, p.903-909, 2007.
- NOHYNEK, L.J.; ALAKOMI, H.; KÄHKÖNEN, M.P.; HEINONEN, M.; HEINONEN, I.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.; PUUPONEN-PIMIA, R.H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. **Nutr. Cancer**, v.54, p.18-32, 2006.
- OU, B.; HAMPSCH-WOODILL, M.; PRIOR, R.L. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity (ORAC) assay using fluorescein as the fluorescent probe. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p.4619-4626, 2001.
- OW, Y.Y.; STUPANS, I. Gallic acid and gallic derivatives: effects on drug metabolizing enzymes. **Curr Drug Metab.**, v.4, n.3, p.241-248, 2003.
- PETERS, C. A.; SGROTT, R. A. G.; PETERS, R. R.; MOTERLE, D.; MADEIRA, F.; EMER, A.A.; PIOVEZAN, A.P.; KANIS, L.A. Production of Wilbrandia ebracteata extract standardized in flavonoids and dihydrocurcubitacin and assessment of its topical anti-inflammatory activity. **Ind Crop Prod.**, v.69, p.123–128, 2015.
- PRIOR, R.L.; HOANG, H.; GU, L.; WU, X.; BACCHIOCCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JACOB, R. Assays for hydrophilic and lipophilic antioxidant capacity (oxygen radical absorbance capacity (ORAC_{FL})) of plasma and other biological and food samples. **J. Agric. Food Chem.**, v.51, p.3273-3279, 2003.
- SARJIT, A.; WANG, Y.; DYKES, G.A. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic Campylobacter is strain specific and associated with a loss of calcium ions. **Food Microbiology** v.46, p.227-233, 2015.
- SAVI, L.A.; LEAL, P.C.; VIEIRA, T.O.; ROSSO, R.; NUNES, R.J.; YUNES, R.A.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; BARARDI, C.R.; SIMÕES, C.M. Evaluation of anti-herpetic and antioxidant activities, and cytotoxic and genotoxic effects of synthetics alkyl-esters of gallic acid. **Arzneimittelforschung**, v.55. n.1, p.66-75, 2005.
- SAWAYA, A. C. H. F.; BARBOSA DA SILVA CUNHA, I.; MARCUCCI, M. C. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. **Chem. Cent. J.**, v.5, n.1, p.27, 2011.

SHARMA, V.; JANMEDA, P. Extraction, isolation and identification of flavonoid from *Euphorbia neriifolia* leaves. **Arabian J. Chem.** 2014; <http://dx.doi:10.1016/j.arabjc.2014.08.019>

SILVA, B. B.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SOUZA, V.C.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S.M. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. **Evid. Based Complement. Alternat. Med.**, v.5, n.3, p.313–316, 2008.

SILVA, T.M.S.; SANTOS, F.P.; EVANGELISTA-RODRIGUES, A.; SILVA, E.M.S.; SILVA, G.S.; NOVAIS, J.S.; SANTOS, F.A.R.; CAMARA, C.A. Phenolic compounds, melissopalynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. **J. Food Comp. Anal.**, v.29, p.10–18, 2013.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and others oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In: London: p.152-178, 1999.

VASUDEVA, N.; MANISHA, V.; SHARMA, S.K.; SARDANA, S. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*. **Pharmacogn Rev.**, v.3, p.307-319, 2009.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este estudo, além de fornecer importantes conhecimentos básicos sobre a espécie *D. ecastaphyllum* da região do baixo São Francisco demonstrou informações relevantes, com relação aos tipos de metabólitos secundários encontrados em diferentes partes da planta, através da avaliação fitoquímica desta espécie.

A análise molecular da região ITS evidenciou a existência de uma única população homogênea de *D. ecastaphyllum* na região em estudo. Isto corroborou com os resultados encontrados nas análises de impressões digitais que demonstraram perfis químicos semelhantes entre as amostras de Sergipe e Alagoas. A análise cromatográfica identificou os marcadores químicos para a própolis vermelha de Alagoas nas amostras de *D. ecastaphyllum* e própolis vermelha do estado de Sergipe. Serão necessários mais estudos comparativos entre a própolis vermelha alagoana com própolis de Sergipe e outras regiões do nordeste do Brasil, visando à possibilidade de a denominação de origem deste produto apícola ser estendido para estas regiões.

Neste estudo, observou-se que qualquer parte da planta pode ser utilizada, a fim de obter os marcadores químicos de própolis vermelha. Os resultados inferem que para a produção de extratos da *D. ecastaphyllum* a melhor parte da planta a ser utilizada é a entrecasca, pois foi nesta que encontramos a maior concentração dos compostos marcadores. Serão necessários mais estudos para identificar outras possíveis substâncias ativas que por ora não foram identificadas.

Os resultados desse estudo demonstraram que a espécie *D. ecastaphyllum* promete ser um ativo terapêutico importante, visto que os extratos evidenciaram atividade frente a cepas clínicas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Foi observado que os compostos majoritários (ácido gálico e formononetina) identificados em todas as amostras da espécie vegetal possuem atividade antimicrobiana frente às mesmas cepas. Contudo, ao diminuir proporcionalmente a concentração do ácido gálico em relação à formononetina a atividade antimicrobiana destes compostos se manteve. Isto demonstrou a potência biológica do composto ácido gálico. Entretanto, serão necessários mais estudos para avaliar a atividade antimicrobiana destes compostos individualmente a fim de comprovar esta hipótese.

A semelhança genética entre os espécimes de *D. ecastaphyllum* e a presença de vários marcadores químicos (os isoflavonoides formononetina, biochanina A, pinocembrina e daidzeína) de grande interesse biotecnológico, bem como facilidade de propagação lenta desta

planta no sistema de cultura permite a exploração de um novo modo de obter compostos bioativos diretamente a partir de extratos de entrecasca de *D. ecastaphyllum*.

APÊNDICE A – Artigo publicado na Journal of Apicultural Science

DOI: 10.2478/JAS-2014-0024 J. APIC. SCI. VOL. 58 NO. 2 2014



Original Article

BOTANICAL ORIGIN OF THE BRAZILIAN RED PROPOLIS: A NEW APPROACH USING DNA ANALYSIS

Sona Jain*
Glúlia Marchiori
Lucyana Mendonça
Marcus Batista
Edilson Araújo

Department of Biology, Federal University of Sergipe
Av. Marechal Rondon, s/n Jardim Rosa Elze, 49100-000 São Cristóvão (Sergipe), Brazil

*corresponding author: sonajain24@yahoo.com
Received 19 August 2014; accepted 12 November 2014

Abstract

Propolis is produced by the honeybees by using resin and other plant secretions. Propolis from different geographical regions have different chemical compositions. This is because the chemical constituents of propolis depend on the vegetation surrounding the apiary. In this report we present a new approach using DNA barcoding for the identification of the botanical origin of propolis. Red propolis samples were collected at different times of the year from the state of Sergipe situated in Northeast Brazil. Extraction of the DNA from propolis was made using a CTAB method. Amplification was done using ITS2 universal primers, followed by DNA sequencing. Sequence analysis confirmed the presence of *Dalbergia ecastaphyllum* in the Brazilian red propolis. Formononetin is a chemical marker for the Brazilian red propolis and *D. ecastaphyllum*. Propolis samples analysed by DNA sequencing, were also checked by Ultra-Fast Liquid Chromatography for the presence of formononetin. Peaks corresponding to formononetin were observed in all the analysed propolis samples. This is the first report of the botanical origin of propolis using DNA technology.

Keywords: *Apis mellifera*, Brazilian red propolis, DNA, formononetin, molecular approach, plant source.

INTRODUCTION

Propolis is a complex resinous mixture collected by *Apis mellifera* from various plant sources. It is composed of resin acquired from the bark of the trees and leaf buds. The material is masticated by the honeybees, partially digested with the salivary enzymes and mixed together with beeswax. (Chisalberti, 1979; Marcucci, 1995; Bankova et al., 2000). Propolis is used to seal the holes in the honeycombs, smooth internal walls and protect the entrance against intruders (Chisalberti, 1979; Greenway, 1990). Propolis is known for its antimicrobial, anticancer, anti-inflammatory, anti-HIV, antiseptic, and antioxidant properties. The list of its industrial and pharmaceutical uses is nearly endless (Burdock, 1998; Bankova et al., 2000). Propolis has been used in folk medicine since 300 BC and its use recently in food and beverages, cosmetics, formulations for cold syndromes, mouth washes, and tooth-

pastes has increased extensively due to its health-related benefits (Chisalberti, 1979; Bankova et al., 2000; Banskota et al., 2001; Wagh, 2013). Medicinal and biological properties of a particular type of propolis are dependent on its chemical composition which in turn is dependent on the chemical constituent of the resin collected by the bees. Hence, propolis from different geographical regions, or propolis collected in different seasons of the year, vary in their chemical content due to changes in the vegetation type surrounding the apiary (Chisalberti et al., 1978; Greenway et al., 1990; Marcucci, 1995; Simões-Ambrosio et al., 2010). It is, therefore, important to connect a particular propolis to its plant of origin. In this way, a specific propolis from a determined area or a set time of the year, can be linked to its biological significance or medical applications. Bud exudate of poplar trees are the main source of propolis from Europe and China (Bankova et

al., 2000). The plant origin of Brazilian propolis is more complicated because of Brazil's rich botanical diversity. Twelve different types of Brazilian propolis were reported by Park et al. (2002) based on their chemical composition and geographical location. A new type of propolis called the Brazilian red propolis, was reported by Dausch et al. (2008) along the sea and river shores of Northeast Brazil. Chromatographic methods, microbotanical analysis, and direct observation of the collecting behavior of the bees are the most commonly utilized methods for the botanical identification of propolis. (Salatino et al., 2005; Telxela et al., 2005; Dausch et al., 2008). The botanical origin of most of the Brazilian green propolis is reported to be alecrim plants (*Baccharis dracunculifolia*). The origin was found by observing the collecting behavior of the bees and analysing the anatomical characteristics of alecrim vestiges in resin and propolis (Marcucci and Bankova, 1999; Kumazawa et al., 2003). The botanical origin of the Brazilian red propolis was found to be *D. ecastaphyllum* in a similar way: by observing the collection behavior of the bees, and by comparison of the phenolic compounds present in the plant exudate and propolis with the use of reverse phase chromatography (Dausch et al., 2008; Silva et al., 2008). However, the above mentioned conventional methods can be tedious, and require skilled labor and a good state of conservation of the morphological structures. Molecular methods using molecular genetics are emerging as powerful identification tools due to their accuracy and rapidness. Among these, the use of DNA barcoding is of special interest as it does not require any prior knowledge of the DNA under analysis. Also, DNA barcoding primers amplify short DNA sequences and hence tend to work better in the case of slightly fragmented template DNA (Gallimberti et al., 2013). Propolis contains plant resins, pollen, and most importantly, other plant fragments which can be the source of DNA and utilized for the identification of its botanical origin. Extraction of DNA from propolis was reported for the first time in our previous publication (Jain et al., 2014). Now, in our present manuscript, we present a novel approach for the identification of the botanical origin of propolis. Using DNA sequencing, we also confirm the presence of *D. ecastaphyllum* in the red propolis samples collected from the state of Sergipe, Northeast Brazil.

MATERIAL AND METHODS

Sample collection

All the propolis samples were collected from the same apiary located in Sergipe, Brazil (S 10°28'25" and W 36°26'12", over a period of one year. Samples showing the red coloration typical of Brazilian red propolis from the months of February, April, May, and September were selected for analysis.

Ultra-Fast Liquid Chromatography (UFLC)

The sample for UFLC was prepared by extracting 1g of propolis with 12.5 mL of 70% ethanol at room temperature, for 1 hour in an ultrasound bath. After extraction, the mixture was centrifuged, and the supernatant was evaporated under low pressure to produce Hydroalcoholic Propolis Extracts (HPEs) used for UFLC. A reverse-phase column (XP-ODS 50 x 3 mm; particle size, 2.2 µm) with a diode array detector (Shimadzu Co.) was used according to the method described by Alencar et al. (2007) and Cabral et al. (2009), with modifications. Methanol (50 mg/mL) was used to dissolve the HPE. Then the substance was filtered with a 0.45 µm filter (Millipore). Next, 2 µL aliquots of 1% HPE (w/v) were injected into the UFLC system. The column was eluted using a linear gradient of water (solvent A) and methanol (solvent B) with a solvent flow rate of 0.4 mL/min. The gradient was started at 40% B, increased to 60% B (after 22.5 min), held at 90% B (37.3-42.3 min), and then decreased to 30% B (after 42.3 min). Chromatograms were recorded at 260 nm and processed using LC Solutions software. Formononetin was used as a standard.

DNA extraction and PCR

Propolis (5 g) was washed with hexane. Then, 200 mg of each pre-washed sample was used for DNA extraction using a CTAB method as described by Jain et al. (2013, 2014). The extracted DNA was dissolved in 25 µL of TE and stored at -20°C for further use.

Polymerase chain reaction was carried out to amplify the variable ITS2 region which is a part of ITS locus of nuclear rDNA, using primers on the 5.8S and 28S conserved regions. Amplification was carried out using 1 µL of 1:10 diluted stock DNA, 0.5 µM primers Bel1, and S3R (Chen et al., 2010; Gao et al., 2010), and 10 µL of 2 X Red PCR mix (Amplicon, Denmark) in a final volume of 20 µL. The following conditions were used to perform PCR: 94°C/5 min, followed by 40 cycles of 94°C/30 seconds, 65°C/30 seconds, 72°C/45 seconds, and a final extension at 72°C for

10 min. After PCR, 5 μ L of the reaction mixture was run on 1.5% agarose gel, stained with SYBR Green (SYBR Green I, Biotechnology LCG) and visualised under UV. Leaf samples of *D. ecastaphyllum* collected from the same region as the propolis were utilised for PCR analysis as a positive control. DNA preparation, PCR and sequencing were repeated 2 - 4 times for each sample in independent experiments with similar results.

DNA sequencing

Polymerase chain reaction-amplified DNA bands were purified using NucleoSpin® Gel and a PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel, Germany), quantified and sequenced. Sequencing reactions were carried out with the ABI PRISM BigDye® Terminator Cycle Sequencing V3.1 kit (Applied Biosystems). The amplified products were sequenced directly using the ABI 3500 DNA sequencer (Applied Biosystems). Sequencing quality and contig assembly were assessed using Pregap4 and Gap4 programs, which are part of the Staden package (Staden, 1996). Only sequences with a Phred value above 30 were considered for the contig assembly. Local sequence alignments were carried out to determine the sequence identity when compared to other sequences from GenBank, using BLAST with default parameters (Altschul et al., 1990). All the samples were sequenced twice from two independent experiments.

RESULTS

The results of the PCR analysis from four different propolis samples (lanes 3 - 6) and two different *D. ecastaphyllum* samples (lanes 1 - 2) are shown in Figure 1. Polymerase chain reaction amplification with the plant specific primers as described in the Material and Methods section, produced a single band of approximately 400 bp in all the samples including the positive controls. Sequence analysis of these PCR amplified bands was carried out to know the source of these DNA bands. Sequencing results confirmed that all the samples and the controls amplified the same ITS2 region. The DNA sequences presented Phred values above 30, which indicate good quality for molecular identification. An online database-comparison of the 400 bp amplified ribosomal fragment with the sequences present in the GeneBank showed 100% identity with ITS2 fragment from *D. ecastaphyllum*, [Accession number EF451072] and *D. monetariae* [Accession number EF451073]. Ultra-Fast Liquid Chromatography (UFLC) chromatograms of the four propolis samples analysed in this study are shown in Fig.2. Chromatographic profiles of all the samples showed formononetin as one of the major compounds. The amount of formononetin did differ depending on the time of the year.

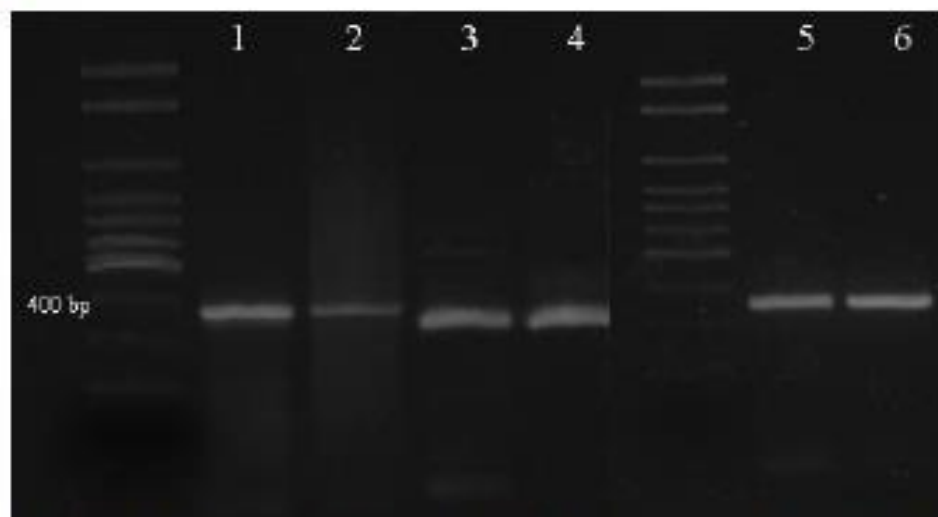


Fig. 1. PCR analysis using primers Bel1 and S3R. Lanes 1 - 2 *D. ecastaphyllum*. Lanes 3 - 6 propolis samples from the months of February, April, May, and September.

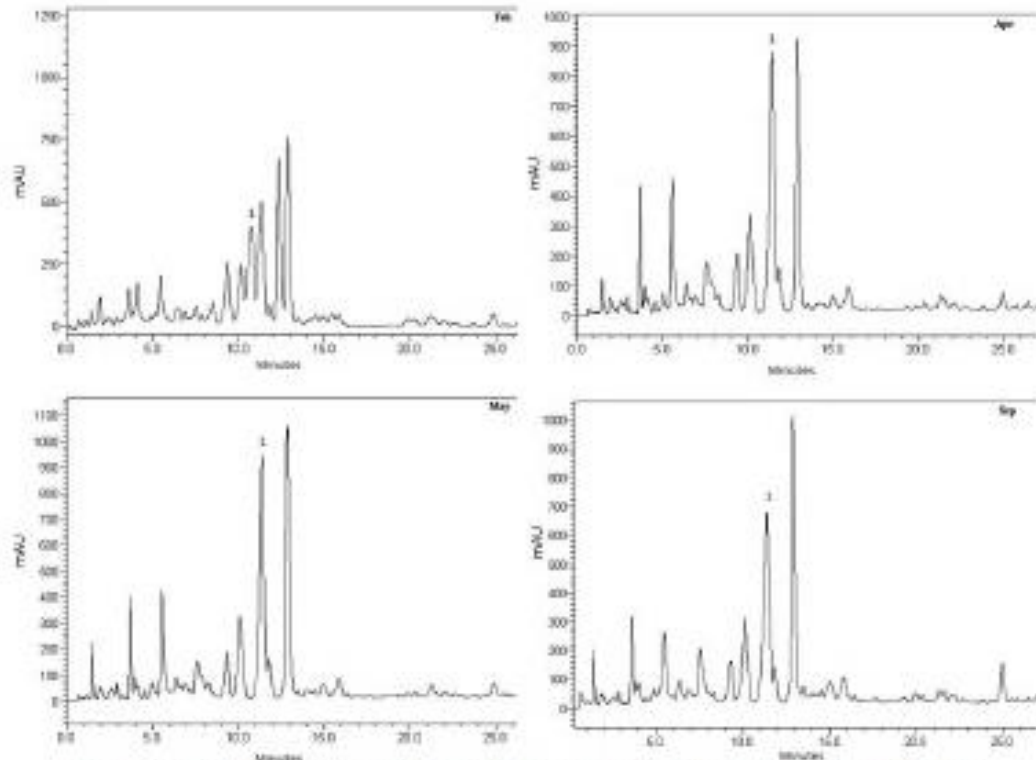


Fig. 2. UPLC chromatograms of the Hydroalcoholic propolis extracts (HPE) collected in the months of February, April, May, and September. Number 1 denotes the peak corresponding to formononetin.

DISCUSSION

A taxonomic identification tool, DNA barcoding, identifies polymorphisms in DNA samples under analysis by PCR and DNA sequencing. It is based on the fact that genome of plants, animals, and microorganisms contain small conserved regions which can be used for their identification. The most commonly utilised barcoding regions in plants are *MatK*, *rbcl*, *ITS*, *trnH-psbA* (Gao et al., 2010; Crautlein et al., 2011). In this report, *ITS2* locus was amplified and sequenced to confirm the presence of *D. ecastaphyllum* in the red propolis samples from Northeast Brazil. To reduce the size of the amplified band, and thus increase the probability of DNA amplification from propolis DNA, the *ITS2* region instead of the whole *ITS* locus was targeted.

Comparison of the PCR amplified bands from the propolis samples and the sequences present in the GenBank, showed 100% identity with *ITS2* fragment from both *D. ecastaphyllum*, and *D. monetaria*. This is probably true because DNA barcodes differ less

among individuals of the same species than among species. However, *D. ecastaphyllum* is the only species of *Daiberigia* found in this region (Carvalho, 1997). Moreover, the amplified fragments from *D. ecastaphyllum* used as a control showed 100% identity with the DNA sequences from propolis samples, thus, supporting our results.

Chromatographic analysis confirmed the presence of formononetin in all the propolis samples analysed in this study. Formononetin is reported to be one of the main constituents of *D. ecastaphyllum* and red propolis samples from Northeast Brazil and can be used as a chemical marker for their identification (López et al., 2014). Also, the analysis by Silva et al. (2008), Daugsch et al. (2008) and López et al. (2014) which compare the chemical constituents of propolis from Northeast Brazil and *D. ecastaphyllum* by chromatographic methods, confirmed *D. ecastaphyllum* as one of the main sources of resin for the Brazilian red propolis.

The results of our sequence analysis confirmed the results published by Silva et al. (2008), Daugsch

et al. (2008), and López et al. (2014). In our study, *D. ecastaphyllum* was found to be present in all the propolis samples that we analysed. We are the first to use a DNA based method.

Chemical analysis of the resins present in propolis by: chromatographic methods, micro analysis of the plant fragments present in the propolis as was the case of green propolis from Brazil, and direct observation of bee behavior, are the methods currently utilised for the botanical origin of propolis (Kumazawa et al., 2003; Teixeira et al., 2005; Daugsch et al., 2008). The presence of contaminants and the formation of resin complexes of diverse botanical origins can significantly hamper the sensitivity of the chromatographic methods. Similarly, morphological identification of the plant micro fragments present in the resin can get very difficult and time consuming. The identification of the botanical micro structures require a profound knowledge of the micro-morphology of the plant species, which is an area with a great shortage of skilled professionals. This analysis also requires a good state of conservation of the morphological structures of the plant material, which is generally poor. On the other hand, DNA based methods represent a quick and reliable identification method, less dependent on the state of conservation of the morphological structure of the plant material. In this work, we used the same basic principle used in the identification of green propolis from Brazil. However, we assumed that the presence of micro-botanical fragments in resin could serve as a source of DNA for its amplification by PCR using barcoding primers that amplify small DNA fragments, and seem to work well even in the case of slightly fragmented DNA (Galimberti et al., 2013). This DNA based method represents a new methodological approach completely independent of the most commonly used chemical method for the identification of the botanical origin of propolis, and can be used as a complementary tool for its confirmation. The DNA based method in this study was tested with the red propolis from Brazil and needs to be tested with other types of propolis. Propolis produced from other plant material may contain substances, whose removal using the described procedures, may not be possible. Among these substances, inhibitors of DNA polymerases could occur, inhibiting PCR reaction. Thus, the method might need special adjustments in some cases and might not function with all the types of propolis.

CONCLUSION

The molecular approach presented in this study, was successfully utilised for the identification of the botanical origin of red propolis. The results prove the usefulness of DNA analysis as an important tool for the determination of the botanical origin of propolis. This DNA-based method is a totally new approach for the botanical identification of propolis. The method can be utilised together with conventional methods for the confirmation of the presence or absence of a particular plant species.

ACKNOWLEDGEMENT

The authors would like to thank the Technology Platform of Sequencing of Genomics and Gene Expression Laboratory - LABCEN/CCB/UFPE for the use of its facilities, and the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado de Sergipe (FAPITEC-SE) for the financial grant that supported this work.

REFERENCES

- Alencer S. M., Oldoni T. L. C., Castro M. L., Cabral I. S. R., Costa-Neto C. M., Cury J. A., Rosalen P. L., Ikegaki M. (2007) Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology* 113(2): 278-283.
- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman D. J. (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215(3): 403-410. DOI: 10.1016/S0022-2836(05)80360-2
- Benkova V. S., Castro S. L., Mercucci M. C. (2000) Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie* 31(1): 3-15. DOI: 10.1051/apido:2000102
- Benkova A. H., Tezuka Y., Kadota S. (2001) Recent progress in pharmacological research of Propolis. *Phytotherapy Research* 15(7): 561-571. DOI: 10.1002/ptr.1029
- Burdock G. A. (1998) Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food and Chemical Toxicology* 36(4): 347-363. DOI: 10.1016/S0278-6915(97)00145-2

- Cebalí I. S. R., Oldani T. L. C., Prado A., Bezerra R. M. N., Alencar S. M. (2009) Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante de própolis vermelha brasileira. *Química Nova* XY(00): 1-5.
- Cervinho A. M. (1997) A Synopsis of the Genus *Delbergia* (Fabaceae: Delbergiaceae) in Brazil. *Brittonia* 49(1): 87-109.
- Chen S., Yao H., Han J., Liu C., Song J., Shi L., Zhu Y., Ma X., Gao T., Pang X., Luo K., Li Y., Li X., Jia X., Lin Y., Leon C. (2010) Validation of the ITS2 region as a novel DNA barcode for identifying medicinal plant species. *PLoS ONE* 5(1): e8613. DOI: 10.1371/journal.pone.0008613
- Crautelin M., Korpeläinen H., Pietiläinen M., Rikkinen J. (2011) DNA barcoding: a tool for improved taxon identification and detection of species diversity. *Biodiversity and Conservation* 20(2): 373-389. DOI: 10.1007/s10531-010-9964-0
- Deusch A., Moraes C. S., Fort P., Park Y. K. (2008) Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 5(4): 435-441. DOI: 10.1093/ecam/nem057
- Gelimberti A., Mattia F. D., Lase A., Bruni L., Federici S., Casiraghi M., Martellos S., Labra M. (2013) DNA barcoding as a new tool for food traceability. *Food Research International* 50(1): 55-63. DOI: 10.1016/j.foodres.2012.09.036
- Gao T., Yao H., Song J., Liu C., Zhu Y., Ma X., Pang X., Xu H., Chen S. (2010) Identification of medicinal plants in the family Fabaceae using a potential DNA barcode ITS2. *Journal of Ethnopharmacology* 130(1): 116-121. DOI: 10.1016/j.jep.2010.04.026
- Ghisalberti E. L. (1979) Propolis a review. *Bee World* 60: 59-84.
- Ghisalberti E. L., Jefferies P. R., Lanteri R., Matison J. (1978) Constituents of Propolis. *Experientia* 34: 157-158.
- Greenway W., Scaysbrook T., Whatley F. R. (1990) The composition and plant origin of propolis: a report of work at Oxford. *Bee World* 71(3): 107-118.
- Jain S., Jesus F. T., Marchiori G. M., Araújo E. D. (2013) Extraction of DNA from honey and its amplification by PCR for botanical identification. *Food Science and Technology* 33(4): 753-756. DOI: 10.1590/S0101-20612013000400022.
- Jain S., Marchiori G. M., Costa A. C., Araújo E. D. (2014) Extraction and amplification of DNA from Brazilian red propolis. *Scientia Plena* 10(3): 039902.
- Kumazawa S. H., Yoned M., Shibata I., Kanaeda J., Hamasaka T., Nakayama T. S. (2003) Direct evidence for the plant origin of Brazilian propolis by the observation of honey-bee behavior and phytochemical analysis. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 51(5): 740-742. DOI: 10.1248/cpb.51.740
- López B. G., Schmidt E. M., Eberlin M. N., Alexandre C. H. F., Sawaya A. C. (2014) Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chemistry* 146: 174-180.
- Marcucci M. C. (1995) Propolis: Chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie* 26(2): 83-99. DOI: 10.1051/apido:19950202
- Marcucci M. C., Bankova V. S. (1999) Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian Propolis. *Current Topics in Phytochemistry* 2: 115-117.
- Park Y. K., Alencar S. M., Aguiar C. L. (2002) Botanical origin and chemical composition of Brazilian Propolis. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 50(9): 2502-2506.
- Salatino A. J., Teixeira E. W., Negri G., Messias D. (2005) Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 2(1): 33-38. DOI: 10.1093/ecam/neh060
- Silva B. B., Rosalen P. L., Cury J. A., Mesaharu I., Souza V. C., Esteves A., Alencar S. M. (2008) Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian Propolis. Evidence-Based Complementary Alternative Medicine 5(3): 313-316. DOI: 10.1093/ecam/nem059
- Simões-Ambrosio L. M., Gregório L. E., Sousa J. P., Figueiredo-Rinhel A. S., Azzolini A. E., Bastos J. K., Lucisano-Valim Y. M. (2010) The role of seasonality on the inhibitory effect of Brazilian green propolis on the oxidative metabolism of neutrophils. *Fitoterapia* 81(8): 1102-1108. DOI: 10.1016/j.fitote.2010.07.008
- Staden R. (1996) The Staden Sequence Analysis Package. *Molecular Biotechnology* 5(3): 233-241.

Teixeira E. W., Negri G., Meira R., Messias D., Seletino A. (2005) Plant Origin of Green Propolis: Bee Behavior, Plant Anatomy and Chemistry. Evidence-Based Complementary Alternative Medicine 2(1): 85-92. DOI: 10.1093/ecam/neh055

Wagh V. D. (2013) Propolis: a wonder bees product and its pharmacological potentials. Advances in Pharmacological Sciences 2013: 308249. DOI: 10.1155/2013/308249

APÊNDICE B – Artigo submetido a Brazilian Archives of Biology and TechnologyBrazilian Archives of Biology and Technology

Submission Confirmation

 Print

Thank you for your submission

Submitted to

Brazilian Archives of Biology and Technology

Manuscript ID

BABT-2016-0461

Title

Phenolic Composition and Leishmanicidal Activity of Red Propolis and *Dalbergia ecastophyllum* (L.) Taub (Fabaceae) Extracts from Sergipe, Brazil

Authors

Araujo, Jaltaira

Mendonça-Melo, Lucyana

Araujo, Edilson

Fernandes, Roberta

Scher, Ricardo

Title: Phenolic Composition and Leishmanicidal Activity of Red Propolis and *Dalbergia ecastaphyllum* (L.) Taub (Fabaceae) Extracts from Sergipe, Brazil

Running title : Leishmanicidal activity of Red Propolis

Abstract

Leishmaniasis is a parasitic disease caused by *Protozoa* of the *Leishmania* genus. It may manifest in visceral and tegumentary forms, and pentavalent antimonials are the first choice drugs used for the treatment. Frequently these drugs show low efficiency and high toxicity to mammalian host. The present study describes the chemical profile and the *in vitro* leishmanicidal effects of red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum* extracts from Sergipe, Brazil, in *Leishmania chagasi* and *Leishmania amazonensis* promastigotes. The phenolic composition of the extracts was evaluated by direct infusion electrospray ionization mass spectrometry (ESI-MS) fingerprinting. The leishmanicidal effect was evaluated by the Resazurin colorimetric method. Similar composition profiles have been found for *D. ecastaphyllum* and propolis samples. The isoflavones formononetin, biochanin A, daidzein and pinoresinol were identified in both extracts. Propolis extract showed leishmanicidal activity in both *L. chagasi* and *L. amazonensis*, with IC_{50} values of 21.54 and 9.13 $\mu\text{g/mL}$, respectively. The *D. ecastaphyllum* extract presented activity only in *L. amazonensis*, with IC_{50} of 5342 $\mu\text{g/mL}$. These results suggest that red propolis extract from Sergipe has the leguminosae *D. ecastaphyllum* as botanical origin, and that it presents potential leishmanicidal activity, which may be associated with the presence of the phenolic compounds found in its composition.

Keywords: Brazilian redpropolis, chemical composition, *Leishmania amazonensis*, *Leishmania chagasi*

INTRODUCTION

Leishmaniasis is an anthroponozoonosis caused by Protozoan parasites of the genus *Leishmania*, remains one of the world's most devastating neglected tropical diseases¹. Recent data have shown that over 98 countries and territories are endemic to leishmaniasis, and 1.3 million new cases occur each year^{2,3}. Clinical manifestations of leishmaniasis are complex, and depend on the parasite species and on the host's immune response⁴. The tegumentary form can be caused by at least fourteen *Leishmania* species, including *Leishmania amazonensis*, which is the etiologic agent of this disease in Brazil⁵⁻⁷. Visceral leishmaniasis is caused by species of the *Leishmania donovani* complex, and *Leishmania chagasi* is the main etiologic agent in Brazil⁸.

Pentavalent antimonials, particularly sodium stibogluconate (Pentostam®), and N-methylglucamine (Glucantime®) are the first-choice drugs used in leishmaniasis chemotherapy. Other drugs, such as pentamidine and amphotericin B have been used as second-choice chemotherapeutic drugs. However, both the sodium stibogluconate and the other drugs require long-term parenteral administration, and present serious side effects⁹. In addition, the development of resistance to treatment by the parasites represents an additional and major problem¹⁰. Thus, there is an increasing demand for new substances that can be used to develop more effective therapies and with fewer side effects.

Propolis is potential source of bioactive compounds. It is a complex mixture of resinous, gummy and balsamic substances collected by honeybees from plant exudates^{11,12}. Several biological properties have already been assigned to propolis, including healing, antimicrobial, antifungal, anti-inflammatory,

antitumor, antioxidant and hepatoprotective action¹¹⁻¹⁸. Furthermore, several studies have demonstrated leishmanicidal action of several types of propolis¹⁹⁻²¹.

The biological properties of propolis are directly linked to its chemical composition, which may vary according to the season of collection, but it mainly depends on the climate and on the flora of the region where the apiary is located²². In regions of temperate climate, for instance, the propolis derived from the resin of plants of the genus *Populus* is rich in flavonoids, phenolic acids, and esters²³. On the other hand, in tropical areas, plants of the genus *Racchovia* in Brazil, and of the genus *Cússia* in Cuba and Venezuela are the main sources of propolis. In these cases, the propolis is rich in cinnamic acid derivatives, such as p-coumaric acid and prenylated benzophenones^{24,25}.

Thus, in view of the great floristic biodiversity and climatic variations, Brazil has the widest diversity of propolis types²⁶. Among the 13 different types of propolis which have been identified and characterized up to now, Brazilian red propolis (BRP) is the most recent. It presents chemical composition distinct from the other 12 types of Brazilian propolis, and constitutes a promising source of new compounds of the classes of the chalcones, pterocarpanes, isoflavones and polyphenols^{17,27}.

Frozza et al.¹¹ pointed out that red propolis from Sergipe is composed of complex molecules and presents important biological properties related to the antioxidant capacity and inhibition of the proliferation of tumor cells. In addition to the differences in the chemical composition when compared with other types of propolis that have already been identified, Franchi et al.²⁸ reported that red propolis is more cytotoxic than green propolis in leukemia cell lines. The only report of the leishmanicidal activity of red propolis in the Brazilian Northeast refers to the study of Ayres et al.²⁹, which shows that red propolis from Alagoas was more effective in reducing macrophage infection by *L. amazonensis* than the three types of green propolis evaluated. Therefore, the present study was carried out to evaluate the chemical composition of red propolis collected in the Baixo São Francisco region, in the State of Sergipe, Brazil, as well as to determine their possible botanical origin. In addition, the leishmanicidal action of the hydroethanolic extract of red propolis was demonstrated in *L. amazonensis* and *L. chagasi* promastigotes.

MATERIAL AND METHODS

Samples

Red propolis and *Dalbergia ecastaphyllum* samples were collected in Brejo Grande (10°28'25"S; 36°26'12" W), located in the Baixo São Francisco region, state of Sergipe, Brazil. Red propolis was obtained from the propolis collector installed in the Langstroth beehive. Inner bark and floral branches samples of *D. ecastaphyllum* were collected in the apiary surrounding areas. Voucher specimen was deposited at ASE Herbarium of the Federal University of Sergipe under the registration number 19310.

EXTRACTS PREPARATION

The hydroethanolic extract of Red Propolis (HERP) was obtained according to Mendonça et al. (2015), with modifications. Propolis sample (1 g) was extracted with 12.5 mL of 70% (v/v) ethanol at room temperature for 1 hour in ultrasound bath. The mixture was subsequently centrifuged at 3,000 rpm for 5 minutes at 24° C. The extract obtained was concentrated by evaporation at room temperature for 48 hours. For the production of the hydroethanolic extract of *D. ecastaphyllum* (HEDe), 1.5 Kg of the inner bark were dried and powdered, and the material obtained was dissolved in 90% ethanol, and kept at room temperature for five days. After this period, the material was filtered and concentrated on a rotary evaporator (LG LOGEN) at 60°C, with 700 mmHg reduced pressure.

ESI(-)-MS Fingerprints and UHPLC-ESI(-)-MS/MS

The analyses of the ethanolic solutions of the dried extracts (1 mg/mL) were performed on a UHPLC Acquity chromatographer coupled with a TQD Acquity mass spectrometer (Micromass-Waters Manchester, England), with an ESI source according to López et al., (2014). A C18 BEH Waters Acquity column (2.1 mm x 50 mm x 1.7 µm particle size) was used. Solvent A was milli-Q purified water with

0.1% formic acid, and solvent B was methanol. The flow rate was 0.2 mL/min, and 5 μ L of samples were injected with a linear gradient starting at 40% methanol, and increasing to up to 100% methanol in 9 min, held until 11 min, and then returning to the initial conditions, followed by column re-equilibration. ESI ionization in the negative ion mode was used under the following conditions: Capillary -3.00 kV, Cone -30 V, Source Temperature 150°C, Desolvation Temperature 350°C and Collision Energy 30 V, acquiring data between 100 and 800 m/z.

Parasites Cultures

L. chagasi and *L. amazonensis* promastigotes were obtained from the cryobank of Laboratory of Cellular and Molecular Biology of *Leishmania* Federal University of Sergipe. Cultures were maintained in a B.O.D. (Biological Oxygen Demand) chamber at 24°C, in Schneider insect medium (Sigma, St. Louis, MO, EUA), supplemented with 10% fetal bovine serum (Cripion, Brasil), ampicillin (1%), and gentamicin (0.1%) (Sigma, St. Louis, MO, EUA). The parasitic growth curve was obtained from the daily count of parasites in culture for seven days. Promastigotes in exponential growth stage were used in the trials of leishmanicidal activity of the extracts.

In vitro Leishmanicidal Activity

Increasing concentrations of HERP (5 to 90 μ g/mL) and of HEDe (25 to 1000 μ g/mL) were added to microtiter plates (96 wells) containing 1×10^6 promastigotes/mL of *L. chagasi* or *L. amazonensis* per well. After 24 hours incubation in B.O.D. chamber at 24°C, 50 μ L resazurin (3 mM) were added to each well, following 6h incubation. Absorbance was obtained in 570 and 595 nm wavelengths in a Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (Bio Tek) and cell viability was calculated by the following equation:

$$\text{Cell viability} = \frac{\text{Absorbance (test) } 570 \text{ nm} - \text{Absorbance (test) } 595 \text{ nm} \times \text{RO}}{\text{Absorbance (control) } 570 \text{ nm} - \text{Absorbance (control) } 595 \text{ nm} \times \text{RO}} \times 100$$

Viability values of the treatments were normalized by providing the negative control (cultures underwent all the procedures with no extract addition), and were used to calculate the IC₅₀ by regression analyses.

Extracts Cytotoxicity Determination in Macrophages

J774 murine macrophages were seeded in 96 wells microtiter plates (2×10^5 cells per well) and maintained for 12 hours in a 5% CO₂ humidified incubator for attachment. After this period, the supernatant was removed, and it was added 200 μ L of the HERP at concentrations of 40, 60, 80, 100, 120, 140 and 160 μ g/mL. After 24 h additional incubation, the cells were washed, and 200 μ L of the MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) solution (0.5 mg/mL) was added to each well, and the plates were again incubated for 3h. Formazan was solubilized by adding 100 μ L DMSO to each well, and then quantified by the reading of the plates at 570 nm using in a Synergy H1 Hybrid Multi-Mode Microplate Reader (Bio Tek). The 570-nm absorbance readings were normalized to the control (cultures with no extract addition) to get the percentage of viable cells. Cytotoxic concentration (CC₅₀) was obtained by regression.

Statistical Analysis

Results obtained in this study were analyzed using the Graph Pad Prism 4.0 and Microsoft Excel 2010 software. IC₅₀, and CC₅₀ values were obtained by regression analysis. For the plotting, it was used the mean values and the standard deviation obtained from triplicates for each test.

RESULTS AND DISCUSSION

The chemical composition of propolis is related to its botanical origin. Studies based on the behavior of bees and on physicochemical analyses point out trunk exudates of *Dalbergia ecastaphyllum* trees as a potential source of resin for the production of red propolis in the Brazilian Northeast^{12,22-31}.

In this work, ESI(-)-MS fingerprint results showed similar composition profiles for *D. ecastaphyllum* and propolis samples (Fig. 1). It was observed that propolis has m/z 239, 255, 271 and 283 ions which are also present in *D. ecastaphyllum*, although the ionization intensities vary between samples. However, propolis also has ions that are not present in *D. ecastaphyllum* (for example, m/z 299 or m/z 301 ions). This was expected since propolis is defined as a complex mixture of compounds^{12,30}.

Chromatographic analyses by UHPLC-MS along with the analysis of fragmentation profiles allowed the identification of formononetin, biochanin A, daidzein and pinocembrin (Fig. 2). These isoflavones markers have been identified in propolis from several states (Alagoas, Sergipe and Paraíba), and in *D. ecastaphyllum* from Paraíba and Alagoas^{21,31}.

In a recent study carried out by López et al.³¹ 14 red propolis samples from different regions of Brazil and Cuba were characterized by ESI(-)-MS fingerprinting. Such samples were divided into three groups according to the predominance of marker ions, and each group was associated with a different botanical origin. The group with which the red propolis sample collected in the state of Sergipe was associated presented isoflavones biochanin A, formononetin and pinocembrin as marker ions. These markers were also present in the fingerprints of *D. ecastaphyllum*, but they were of low abundance in the spectra of the samples allocated in the other groups.

Jain et al.³² using a new approach, confirmed through DNA sequencing the presence of components of *D. ecastaphyllum* in red propolis from Sergipe, corroborating with other studies that affirm that this species is the botanical origin of red propolis^{12,30,31}.

Another evidence which associates the *D. ecastaphyllum* as the botanical origin of the propolis evaluated in this work is the fact that during the samples collections, honey bees were observed collecting red resinous exudates on the surface of the stem of *D. ecastaphyllum* trees present in the apiaries surrounding areas. The fact that the bees from hives located along the northeastern coast of Brazil visited *D. ecastaphyllum* to collect resin on the plant's surface to produce red propolis has been previously reported^{12,22}.

Although there is a wide range of studies related to the leishmanicidal activity of different types of propolis in different regions of Brazil and the world^{24,25,33-40}, regarding red propolis, especially the red propolis from Sergipe, there is little information available. In this way, it was evaluated for the first time the effects of different concentrations of hydroethanolic extracts obtained from red propolis from Sergipe and of the inner bark of *D. ecastaphyllum* on the growth of promastigotes of *L. amazonensis* and *L. chagasi*. According to Figure 3, there was a reduction in the viability of promastigotes treated with red propolis extract at concentrations ranging between 5 and 90 $\mu\text{g/mL}$. It can also be noticed that *L. amazonensis* promastigotes are more sensitive to HERP (Fig. 3 A) when compared with *L. chagasi* promastigotes (Fig. 3 B).

The concentrations of both extracts which were able to inhibit promastigotes growth in 50% (IC_{50}) ranged from 9.73 to 53.42 $\mu\text{g/mL}$ (Table 1). The HEDe affected only the promastigotes forms of *L. amazonensis*. Compared with the effect of HERP, it was observed that the sensitivity

of the parasites to HEDe is much lower. An HEDe concentration of approximately 10 times higher than HERP was necessary in order to reduce by 90% the viability of promastigotes (fig. 2 C).

Table 1 HERP and HEDe IC₅₀ values for promastigotes of *L. amazonensis* and *L. chagasi*

| Extract | <i>Leishmania</i> Species | IC ₅₀ (µg/mL) |
|---------------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| Red propolis (HERP) | <i>L. amazonensis</i> | 9.73 ± 1.49 |
| | <i>L. chagasi</i> | 21.54 ± 2.58 |
| <i>D. ecastaphyllum</i> (HEDe) | <i>L. amazonensis</i> | 53.42 ± 13.38 |
| | <i>L. chagasi</i> | ND * |

*ND - IC₅₀ Not determined. Results expressed in mean ± standard deviation.

Although this is the first study on leishmanicidal activity of *D. ecastaphyllum* extract, several studies have been carried out with different propolis extracts, and the results demonstrate that propolis has potential leishmanicidal activity against different species of *Leishmania*. Monzote et al.³³ evaluated the effect of 20 Cuban propolis chemotypes regarding the viability of amastigotes forms of *Leishmania infantum*. Among these chemotypes, nine were red propolis, whose IC₅₀ values ranged between 3.3 and 16.1 µg/mL. In the same study, it was demonstrated the activity of red propolis in amastigote forms of *Trypanosoma cruzi* and trypomastigote forms of *T. brucei*, showing that its action extends to other trypanosomatids. Previously, Ayres et al.²⁰ had already described the potential leishmanicidal activity of red propolis from Alagoas.

The authors found that at the concentration of 25 µg/mL, the ethanolic extract of red propolis was able to reduce by 60% the parasite load in macrophages infected by *L. amazonensis*. However, unlike what was observed in our study, extracts of red propolis from Alagoas did not show any direct toxic effect on the promastigotes²⁰. This divergence may be due to differences in the chemical composition of propolis collected in the two states. As showed by our results and, as afore mentioned³¹, the marker ions of red propolis from Sergipe were the isoflavones formononetin, biochanin A, and pinocembrin. On the other hand, in propolis collected in the state of Alagoas, the markers were benzophenones, such as guttiferone E and xanthochymol, probably originated from plants of the family Guttiferae. These facts demonstrate the existence of at least two types of red propolis in the northeastern region of Brazil, and that differences in their chemical compositions may reflect on differences in their biological properties.

CONCLUSIONS

The results of this study showed that propolis collected in the Baixo São Francisco region of the state of Sergipe has as main marker ions the isoflavones formononetin, biochanin A, and pinocembrin, suggesting *D. ecastaphyllum* as its probable botanical origin. In addition, the activity of the hydroethanolic extract of red propolis from Sergipe on the viability of promastigotes of *L. amazonensis* and *L. chagasi* highlights the plant as potential source for future investigations by new leishmanicidal compounds.

REFERENCES

- McDowell MA, Rafati S, Ramalho-Ortigue M, Ben Sahh A. Leishmaniasis: Middle East and North Africa research and development priorities. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 Jul;5(7):e1219.
- WHO, editor. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis; 2010 22–26 March; Geneva. World Health Organization.
- Alvar J, Velez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One*. 2012;7(5):e35671.
- Zimmermann S, Moll H, Solbach W, Luder CG. Meeting Report. IFoLeish2008: current status and future challenges in Leishmania Research and Leishmaniasis. *Protist*. 2009 May;160(2):151-8.
- Barral A, Costa J. Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas [Leishmanias and Tegumentary Leishmaniasis in the Americas]. Salvador; 2011.
- Silveira FT, Lainson R, Corbett CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2004 May;99(3):239-51.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT, de Souza AA, Braga RR, Ishikawa EA. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 1994 Jul-Sep;89(3):435-43.
- Berman J. Visceral leishmaniasis in the New World & Africa. *Indian J Med Res*. 2006 Mar;123(3):289-94.
- Kayser O, Kiderlen AF, Croft SL. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitol Res*. 2003 Jun;90 Suppl 2:S55-62.
- Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis-current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 2003 Nov;19(11):502-8.
- Frozza CO, Garcia CS, Gombato G, de Souza MD, Salvador M, Moura S, et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol*. 2013 Feb;52:137-42.
- Dangda A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008 Dec;5(4):435-41.
- Oliveira AC, Shinohara CS, Longhini R, Franco SL, Svidzinski TI. Antifungal activity of propolis extract against yeasts isolated from onychomycosis lesions. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2006;101(5):493-7.
- Borelli F, Maffia P, Pinto L, Iannaro A, Russo A, Capasso F, et al. Biochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Phytotherapy*. 2002 Nov;73 Suppl 1:S53-63.
- Ozkul Y, Silici S, Eroglu E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture. *Phytotherapy*. 2005 Nov;12(10):742-7.
- Marcucci MC, Ferreres F, Garcia-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol*. 2001 Feb;74(2):105-12.
- Trushcheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Múria PL, et al. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006 Jun;3(2):249-54.
- Bhadauri M. Combined treatment of HEDTA and propolis prevents aluminum induced toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 2012 Jul;50(7):2487-95.
- Silva SS, Thome Gda S, Caneco AH, Miranda MM, Felipe I, Andrade CG, et al. Brazilian propolis antileishmanial and immunomodulatory effects. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:673058.
- Ayres DC, Marcucci MC, Giorgio S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2007 May;102(2):215-20.
- Pontin K, Da Silva Filho AA, Santos FF, Silva ML, Cunha WR, Narayakdara NP, et al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a Brazilian green propolis extract. *Parasitol Res*. 2008 Aug;103(3):487-92.
- Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino-Neto FR. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras [Propolis: 100 years of research and futures perspectives]. *Química Nova*. 2002;25(2):321-6.
- Fakão SI, Vale N, Cos P, Gomes P, Freire C, Nunes L, et al. In vitro evaluation of Portuguese propolis and floral sources for antiprotozoal, antibacterial and antifungal activity. *Phytother Res*. 2014 Mar;28(3):437-43.
- Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000 January-February;31(1):3-15.
- Marcucci MC, Ferreres F, Custodio AR, Ferreira MM, Bankova VS, Garcia-Viguera C, et al. Evaluation of phenolic compounds in Brazilian propolis from different geographic regions. *Z Naturforsch C*. 2000 Jan-Feb;55(1-2):76-81.
- Righi AA, Negri G, Salatino A. Comparative chemistry of propolis from eight Brazilian localities. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:267878.

- 27 Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA, et al. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol*. 2007 Sep 5;113(2):278-83.
- 28 Franchi GC, Jr., Moraes CS, Toreti VC, Daugsch A, Nowill AE, Park YK. Comparison of effects of the ethanolic extracts of Brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2012;2012:918956.
- 29 Piccinelli AL, Campo Fernandez M, Cuesta-Rubio Q, Marquez Hernandez I, De Simone F, Rastrelli L. Isoflavonoids isolated from Cuban propolis. *J Agric Food Chem*. 2005 Nov 16;53(23):9010-6.
- 30 Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteres A, et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008 Sep;5(3):313-6.
- 31 Lopez BG, Schmidt EM, Eberlin MN, Sawaye AC. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chem*. 2014 Mar 1;146:174-80.
- 32 Jain S, Marchioro G, Mendonça L, Batista M, Araújo E. Botanical Origin of the Brazilian Red Propolis: a New Approach Using DNA Analysis. *Journal of Apicultural Science*. 2014;58(2):79-85.
- 33 Manzote L, Cuesta-Rubio Q, Campo Fernandez M, Marquez Hernandez I, Fraga J, Perez K, et al. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. *Adem Inst Oswaldo Cruz*. 2012 Dec;107(8):978-84.
- 34 Machado GMC, L. LL, Castro SL. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of *Leishmania*. *Adem Inst Oswaldo Cruz*. 2007;102(1):73-7.
- 35 Ferreira FM, Castro RA, Batista MA, Rossi FM, Silveira-Lemos D, Frezard F, et al. Association of water extract of green propolis and liposomal meglumine antimoniate in the treatment of experimental visceral leishmaniasis. *Parasitol Res*. 2014 Feb;113(2):533-43.
- 36 Niforoukzadeh MA, Shirani-Bidhadi L, Zolfaghari-Baghbaderani A, Saberi S, Shidat AH, Mahmoudi M. Comparison of *Thymus vulgaris* (Thyme), *Achillea millefolium* (Yarrow) and propolis hydroalcoholic extracts versus systemic glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis in balb/c mice. *J Vector Borne Dis*. 2008 Dec;45(4):301-6.
- 37 Duran G, Duran N, Culha G, Ozcan B, Oztas H, Ozer B. In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. *Parasitol Res*. 2008 May;102(6):1217-25.
- 38 Duran N, Muz M, Culha G, Duran G, Ozer B. GC-MS analysis and antileishmanial activities of two Turkish propolis types. *Parasitol Res*. 2011 Jan;108(1):95-105.
- 39 Ayres DC, Fedek TA, Marcurci MC, Giorgio S. Potential utility of hyperbaric oxygen therapy and propolis in enhancing the leishmanicidal activity of glucantime. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2011 Nov-Dec;53(6):329-34.
- 40 Santana LC, Carneiro SM, Cabral-Neto LB, Arcanjo DD, Moita-Neto JM, Cito AM, et al. Brazilian brown propolis elicits antileishmanial effect against promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. *Nat Prod Res*. 2014;28(5):340-3.

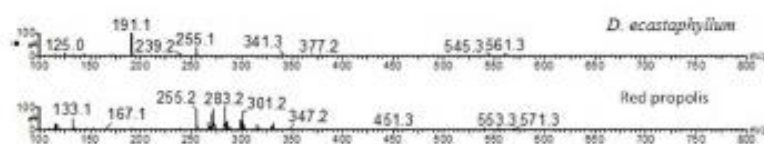


Figure 1: ES(-) -MS fingerprint of *D. ecastaphyllum* and red propolis from Sergipe, Brazil. 171x15mm (96 x 96 DPI)

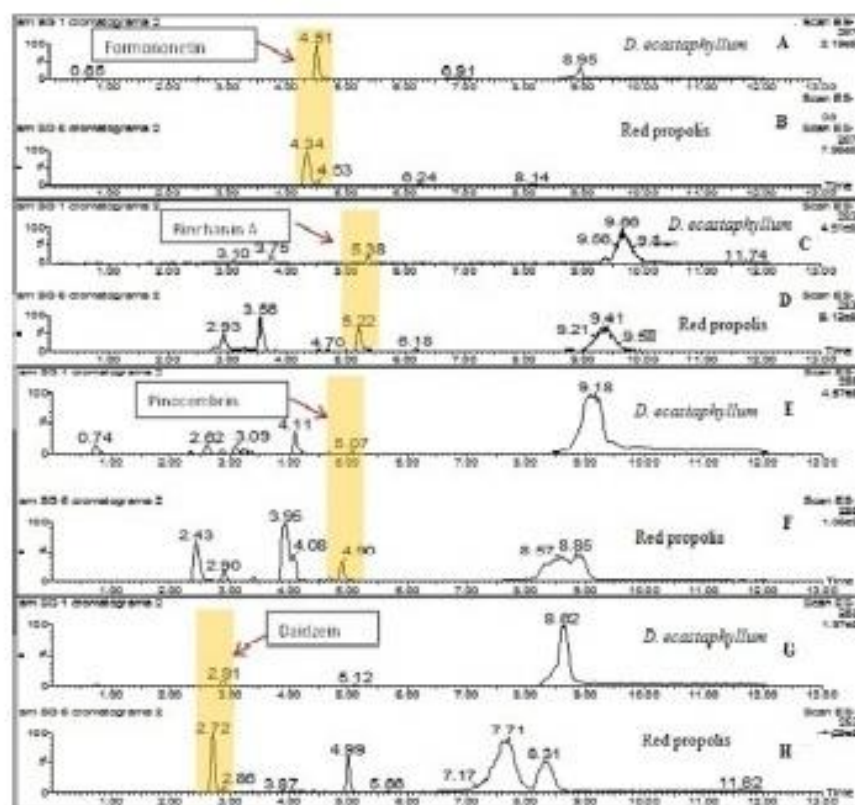


Figure 2: UHPLC-MS extracted ion chromatograms of the ions m/z 267 - formanonesin (A-B), m/z 283 - bichanin A (C-D), m/z 255 - pinocembrin (E-F) and m/z 253 - daidzein (G-H) in *D. ecastaphyllum* and in red propolis from Serapipe. 173x163mm (96 x 96 DPI)

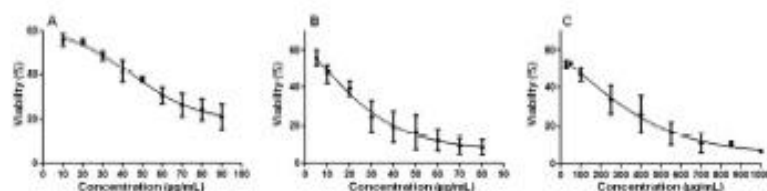


Figure 3 Effect of the hydroethanolic extract of Red Propolis (HERP) on promastigotes of *L. chagasi* (A) and *L. amazonensis* (B), and of the hydroethanolic extract of *D. eczabaphyllum* (EHDe) on promastigotes of *L. amazonensis* (C). The parasites were cultivated for 24h in the presence of increasing concentrations of extracts, and viability was determined by the Alamar Blue method. The dots represent the mean of three independent experiments, and the bars represent the standard deviation.
350x86mm (96 x 96 DPI)

ANEXO A – Comprovante de submissão na Journal of Apicultural Research

Journal of Apicultural Research

Chemical and genetic similarity between *Dalbergia ecastaphyllum* and red propolis from the Northeastern Brazil

--Manuscript Draft--

| | |
|-----------------------------|--|
| Full Title: | Chemical and genetic similarity between <i>Dalbergia ecastaphyllum</i> and red propolis from the Northeastern Brazil |
| Manuscript Number: | |
| Article Type: | Original research article |
| Keywords: | Marker, bioactive compound, designation of origin, identity |
| Manuscript Classifications: | Hive product science |
| Abstract: | <p><i>Dalbergia ecastaphyllum</i> was named the botanical origin of the Brazilian red propolis by chemical and molecular studies increasing the interest in research with this plant species. The National Institute of Industrial Property (INPI), Brazil granted the designation of origin to red propolis and red propolis extract from Alagoas state whose composition includes, among other chemical compounds, formononetin and daidzein. However, several studies have identified the chemical markers of this product in samples of <i>D. ecastaphyllum</i> and propolis of Sergipe state. The objective of this study was to compare the chemical and genetic identity between <i>D. ecastaphyllum</i> populations and propolis samples collected from the north and south banks of the São Francisco river also known as the lower São Francisco region. <i>D. ecastaphyllum</i> samples and propolis from this region showed similar chromatographic profiles and ESI (-) - MS fingerprints. The markers formononetin, biochanin A and daidzein were found in <i>D. ecastaphyllum</i> and propolis collected from Sergipe and Alagoas. DNA sequencing demonstrated that <i>Dalbergia</i> population from Alagoas and Sergipe are highly homogeneous, having exactly the same haplotype. Thus <i>D. ecastaphyllum</i> from the lower São Francisco have the same genetic characteristics and chemical profiles including the chemical markers considered for propolis from Alagoas, asking for more comparative studies between propolis produced in the northeastern region of Brazil with the possible extension of geographical indication to other states as well.</p> |
| Order of Authors: | <p>Lucyana Mendonça-Melo</p> <p>Everton Motta</p> <p>Begoña López</p> <p>Alexandra Sawaya</p> <p>Lisiane Freitas</p> <p>Sona Jain</p> <p>Marcus Batista</p> <p>Edilson Araujo</p> |

ANEXO B – Comprovante de submissão na Journal of Chromatographic Science

Manuscript submitted to Journal of Chromatographic Science



Phytochemical profile and fingerprinting of *Dalbergia ecastaphyllum* from Northeast Brazil

| | |
|-------------------------------|---|
| Journal: | <i>Journal of Chromatographic Science</i> |
| Manuscript ID | Draft |
| Manuscript Type: | Article |
| Date Submitted by the Author: | n/a |
| Complete List of Authors: | Mendonca, Lucyana; Universidade Federal de Sergipe, Jain, Sona; Universidade Federal de Sergipe Lopez, Begona; Universidade Estadual de Campinas Sawaya, Alexandra; Universidade Estadual de Campinas Freitas, Lisiane; Universidade Federal de Sergipe Batista, Marcus; Universidade Federal de Sergipe Araujo, Edilson; Universidade Federal de Sergipe |
| Keyword: | red propolis, chemical markers, HPLC, UHPLC, ESI(-)-MS fingerprint |